

Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen

und Marburg GmbH, Standort Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Roland Frankenberger

Stiftungsprofessur für Experimentelle Orofaziale Medizin

Leiterin: Prof. Dr. Christine Knabe-Ducheyne

Untersuchung des Einflusses hormoneller, alters-, geschlechtsbedingter und lebensstilassoziierter Parameter auf die craniofaziale Knochenregeneration

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

von

Aynur Mele

aus Tekman

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 06.09.2017

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Zahnmedizin der Philipps-Universität Marburg:

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr PD Dr. Dr. Michael Stiller

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Mengel

2. Korreferent: Herr Prof. Dr. Dr. M. Kesting

Für meine Eltern,
meine Schwestern und meine beiden Brüder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV	
Abbildungsverzeichnis	VI	
Tabellenverzeichnis.....	VIII	
1	Einleitung..... 1	
1.1	Hormone..... 1	
1.1.1	Hypothese..... 4	
1.1.2	Studiendesign	4
1.1.3	Fragestellung	5
1.2	Sexualhormone..... 6	
1.2.1	Testosteron	6
1.2.2	Östrogene..... 8	
1.2.3	Entstehung von Testosteron und Östradiol aus Cholesterin..... 9	
1.2.4	Sexalhormon bindendes Globulin (SHBG)..... 11	
1.2.5	Freier Androgenindex (FAI)	11
1.3	Knochenzellen und Remodeling	11
1.3.1	Osteozyten	12
1.3.2	Osteoblasten	12
1.3.3	Osteoklasten	12
1.3.4	Remodeling	13
1.4	Wirkung der Androgene und Östrogene auf den Knochen..... 14	
1.4.1	Altersbedingte Veränderungen..... 16	
1.4.2	Mutationsbedingte Veränderungen	16
2	Material und Methoden..... 18	
2.1	Patientenauswahl und Einteilung	18
2.1.1	Befund, Diagnose und Therapieplanung	19
2.1.2	Bildgebende diagnostische Verfahren..... 21	
2.1.3	Operativer Verlauf der Sinusbodenelevation	21

Inhaltsverzeichnis

2.1.4	Biopsiegewinnung und Implantatsetzung	22
2.2	Verwendetes Knochenersatzmaterial	23
2.2.1	Material.....	23
2.2.2	Charakteristika.....	23
2.2.3	Morphologie	23
2.3	Histologie, Histomorphometrie und Immunhistologie.....	24
2.3.1	Aufbereitung der Proben	24
2.3.2	Immunhistochemische Färbung.....	25
2.3.3	Histomorphometrie.....	27
2.3.4	Immunhistologie.....	28
2.3.5	Statistische Methodik	30
2.3.6	Ethische Erklärung	30
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Klinische Ergebnisse	32
3.2	Histologische Ergebnisse	33
3.2.1	Histomorphometrische Ergebnisse.....	37
3.2.1.1	Knochenbildung.....	37
3.2.1.2	Degradationsverhalten des Knochenersatzmaterials.....	43
3.2.2	Immunhistologische Ergebnisse.....	44
3.2.2.1	Immunhistologische Auswertung der Patientengruppe der Männer.....	44
3.2.2.2	Immunhistologische Auswertung der Patientengruppe der Frauen	46
3.2.2.3	Immunhistologische Auswertung der Patientengruppe mit erhöhtem BMI	49
3.2.2.4	Immunhistologische Auswertung der Patientengruppe mit nicht-erhöhtem BMI	51
3.2.2.5	Immunhistologische Auswertung der Patientengruppe der Raucher.....	53
3.2.2.6	Immunhistologische Auswertung der Patientengruppe der Nichtraucher	55
3.2.3	Zusammenfassung der histomorphometrischen und immunhistochemischen Ergebnisse	57
4	Diskussion.....	61
4.1	Studiendesign	63

Inhaltsverzeichnis

4.2	Diskussion der histologischen Ergebnisse	64
4.3	Diskussion der histomorphometrischen und der immunhistochemischen Ergebnisse	64
5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	68
6	Zusammenfassung	75
7	Literaturverzeichnis	78
8	Danksagung	91
9	Akademische Lehrer	92
10	Lebenslauf	93
11	Ehrenwörtliche Erklärung	94
12	Veröffentlichung	95

Abkürzungsverzeichnis

AI	Androgenindex
ALP	Alkalische Phosphatase
β -TCP	Beta-Trikalziumphosphat
BMA	Butylmethacrylat
BMI	Body mass index
BPO	Benzoylperoxid
BSA	bovines Serumalbumin
BSP	Bone Sialoprotein
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
COL I	Kollagen Typ I
E ₂	Estradiol / Östradiol
ECLIA	Elektrochemolumineszenz–Immunoassay
ECM	Extrazelluläre Matrix
ER	Östrogenrezeptor
ER- α	Östrogen-Rezeptor-alpha
ER- β	Östrogen-Rezeptor-beta
et al.	und andere
FAI	Freier Androgenindex
FGF	Fibroblast Growth Factor
FM	Fibröse Matrix
FSH	Follitropin

Abkürzungsverzeichnis

GnRH	Gonaden-Releasing-Hormon / Gonadotropin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
KM	Knöcherne Matrix
LH	Lutropin
Mg	Magnesium
MMA	Methylmethacrylat
MW	Mittelwert
nmol	Nanomol
OB	Osteoblasten
OC	Osteocalcin
OH	Hydroxyl(-Gruppe)
ON	Osteonectin
OS	Osteoid
OZ	Osteozyten
pg	Pikogramm
PMMA	Polymethylmethacrylat
SHBG	Sexualhormon bindendes Globulin
TGF- β	Transforming Growth Factor- β

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktur- und Summenformel des Testosterons
Abbildung 2:	Struktur- und Summenformel des Östradiols
Abbildung 3:	Biosynthese der Sexualhormone aus Cholesterin
Abbildung 4:	Übersichtsaufnahme einer Biopsie mit eingezeichnetem Vermessungsareal
Abbildung 5:	Histologische Detailaufnahme eines im Knochen eingebetteten Cerospartikel®
Abbildung 6:	Histologische Detailaufnahme mit Partikeldegradation
Abbildung 7:	Histologische Detailaufnahme mit Osteoiddarstellung
Abbildung 8:	Histologische Detailaufnahme mit Knochen-Ceros®-Interface
Abbildung 9:	Histologische Detailaufnahme mit Lining Cells / Osteoblasten
Abbildung 10:	Box-plot-Diagramm für den Knochenanteil in Abhängigkeit des Geschlechts
Abbildung 11:	Box-plot-Diagramm für den Knochenanteil in Abhängigkeit vom BMI
Abbildung 12:	Box-plot-Diagramm für den Knochenanteil in Abhängigkeit vom Rauchverhalten
Abbildung 13:	Punktewolke zur Darstellung des Knochenanteils in Abhängigkeit vom Wert des Androgenindex und dem Geschlecht der Probanden
Abbildung 14:	Punktewolke zur Darstellung des Knochenanteils in Abhängigkeit vom Östradiolwert und Geschlecht der Probanden
Abbildung 15:	Punktewolke zur Darstellung des Knochenanteils in Abhängigkeit vom BMI und dem Geschlecht der Probanden
Abbildung 16:	Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression in der Patientengruppe der Männer

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 17: Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression in der Patientengruppe der Frauen
- Abbildung 18: Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression in der Patientengruppe mit erhöhtem BMI
- Abbildung 19: Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression in der Patientengruppe mit nicht-erhöhtem BMI
- Abbildung 20: Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression in der Patientengruppe der Raucher
- Abbildung 21: Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression in der Patientengruppe der Nichtraucher

Tabellenverzeichnis

Tabelle I: Normwerte der Hormone

Tabelle II: Verwendete primäre Antikörper

Tabelle III: Verwendeter sekundärer Antikörper

Tabelle IV: Ordinale Bewertungsskala

Tabelle V: Übersicht der medizinischen Anamnese und der die den Lebensstil beschreibenden Parameter

Tabelle VI: Mittelwerte aller Marker und ihrer Expressionen in der Patientengruppe der Männer

Tabelle VII: Mittelwerte aller Marker und ihrer Expressionen in der Patientengruppe der Frauen

Tabelle VIII: Mittelwerte aller Marker und ihrer Expressionen in der Patientengruppe aller Patienten mit einem erhöhten BMI

Tabelle IX: Mittelwerte aller Marker und ihrer Expressionen in der Patientengruppe aller Patienten mit einem nicht-erhöhtem BMI

Tabelle X: Mittelwerte aller Marker und ihrer Expressionen in der Patientengruppe aller Raucher

Tabelle XI: Mittelwerte aller Marker und ihrer Expressionen in der Patientengruppe aller Nichtraucher

1 Einleitung

1.1 Hormone

Hormone beeinflussen unser ganzes Leben. Angefangen von der befruchteten Eizelle bis zum Zellzerfall bestimmen sie unser Geschlecht, unsere Entwicklung, unser Aussehen und Verhalten. Schon kleinste Mengen können Auswirkungen auf den Körper haben.

Dass Hormone ein sehr wichtiger Bestandteil des menschlichen Körpers sind, ist in der Medizin bereits in vielen Bereichen bekannt. Sie regulieren und steuern viele Prozesse im Körper. Sei es auf physischer oder psychischer Ebene. Das Fehlen von Studien in der Zahnmedizin und allgemein in der Wissenschaft speziell über die Wirkung der Sexualhormone Östrogen, Testosteron und des Sexualhormon bindenden Proteins (SHBG) auf die Knochenregeneration zeigt aber, dass der Einfluss dieser Hormone noch nicht ausreichend untersucht wurde. Auch wenn die Anzahl der knochenregenerativen Prozesse im craniofazialen Bereich in den letzten zwei Jahrzehnten stetig gestiegen ist, ist unser Wissen in Bezug auf den Effekt von individuellen Parametern der Patienten wie das Geschlecht, der BMI, endokrinologische und die Lebensgewohnheiten betreffende Faktoren auf die craniofaziale Knochenregeneration sehr gering (Cuenin et al., 1997, Chang et al., 2013, Cheng et al., 2013, Giuca et al., 2013). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die embryonale Ossifikation der Plattenknochen einschließlich des craniofazialen Skeletts durch eine desmale Ossifikation (Kim et al., 1998) und die Röhrenknochen der Extremitäten durch chondrale Ossifikation erfolgen (Gerstenfeld et al., 2001, 2003). Lediglich im Bereich der Osteoporosediagnose und -therapie ist die Wirkung dieser Hormone schon längere Zeit diskutiert und untersucht worden (Legrand et al., 2001, Evan, 2002, Lee et al., 2008, Tuck, 2008, Hoppé, 2010). So wurde bereits in einer Tier-Studie nachgewiesen (Gesicki, 2005), dass Östrogene und Androgene knochenbauende und damit auch eine die Frakturheilung fördernde Funktionen haben. In der Humanmedizin ist bei Frauen mit Hormonsubstitution in der Menopause eine Senkung des Osteoporoserisikos schon länger allgemein bekannt. Die Studie an osteoporotischen Frauen (Cummings et al., 1998) zeigte bereits, dass Östrogenmangel in der Postmenopause das Risiko einer Hüftfraktur steigen lässt. In der aktuellen Literatur (Lee et al., 2008) gibt es Hinweise, dass es bei Frauen Zusammenhänge zwischen der Konzentration von Östrogen, Testosteron, SHBG und der Prävalenz von Hüftgelenksfrakturen gibt, wobei SHBG im Gegensatz zu Östrogen und Testosteron eine frakturfördernde Wirkung zeigte.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in der Postmenopause die Aromatisierung von Testosteron außerhalb der funktionslosen Ovarien die Hauptquelle von endogenem Östrogen ist (Riggs et al., 2002). Auch den Fettdepots wird in dieser Periode in geringem Ausmaß ein östrogensynthetisierender Effekt zugeschrieben.

Die Studie an osteoporotischen Frauen zeigte, wie zuvor bereits genannt, auch einen knochenprotektiven Effekt von Testosteron. Zusammenfassend wird dem Testosteron, welches bei Frauen auch in geringen Mengen in den Ovarien gebildet wird, ein anaboler Effekt auf den Knochen, eine Verbesserung der Dichte von Knochenmineralisation und ein positiver Effekt auf die Erhöhung der Muskelmasse zugeschrieben (Notelovitz, 2002).

Zum anderen belegten Studien wie die von Lee (2008), dass sich mit einem hohen Spiegel an freiem SHBG, das Risiko von osteoporotischen Frakturen erhöht. SHBG bindet Östrogen und Testosteron, die dann nicht mehr oder nur reduziert den Rezeptoren im Knochen und den Zielgeweben zu Verfügung stehen. SHBG greift damit in die zelluläre Antwort auf Geschlechtshormone durch SHBG-abhängige Geschlechtshormon-Signaltransduktions-Mechanismen ein.

Sehr interessante Ergebnisse lieferte die Studie von Gesicki (2005). Im Rahmen dieser Studie wurden weibliche und männliche Mäuse nach einer Femurfraktur mit Östrogen und Testosteron behandelt. Im Vergleich zu den Kontrolltieren, denen keine Sexualhormone appliziert wurden, konnten folgende sehr wichtige Aspekte bei der Behandlung von Knochenfrakturen festgestellt werden.

Eines der wichtigen Ergebnisse zeigt, dass die Sexualhormone nur am Ort der Fraktur eine Wirkung auf die Knochenheilung zeigen, denn entsprechende Kontrollbereiche wurden weder positiv noch negativ verändert.

Es kommt am Ort der Frakturheilung, dem sogenannten Kallus, zu einer Erhöhung der Osteoblastenaktivität und somit zu einer gesteigerten Knochenformation. Der Kallus ist hierbei deutlich besser mineralisiert und strukturell durchbaut.

Auch Monaghan untersuchte bereits 1992 an Neuseeland Kaninchen das Vorkommen von Östrogenrezeptoren während der Frakturheilung. Hierbei wurde ein möglicher Einfluss von Östrogen auf die frühe induktive und späte enchondrale Phase der Frakturheilung festgestellt.

Dass auch Testosteron, einen positiven Einfluss auf die Knochenregeneration bzw. -heilung hat, konnten sowohl Frankale und Borrelli (1990) als auch Gesicki (2005) feststellen.

Auch Tarsoly et al. (1979) konnten in ihrer Studie nach einer Hypophysenentfernung ein direktes peripheres Wirken von Testosteron auf die Zellen bzw. auf deren Enzymfunktionen am Ort der Frakturheilung feststellen. In dieser Studie wurde eine Schwächung der Zellenzyme, die die Kallusbildung stimulieren, beobachtet. Durch Testosteronsubstitution wurde dieser negative Effekt gehemmt und somit die Frakturheilung wieder in Gang gesetzt. So wird durch das Fehlen des zentralen Effektes der Hypophyse ein peripheres Wirken des Testosterons ersichtlich.

Gesicki (2005) konnte den Effekt der Verkürzung der Frakturheilungsdauer um 25 % erstmals konkreter benennen.

Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass Sexualhormone, die zur Gruppe der Steroide gehören, im Skelettsystem spezifisch am Ort der Knochenbruchheilung wirken (Gesicki, 2005). Bei den Steroiden handelt es sich um Lipide, aus denen Steroidhormone und Lipoproteine entstehen. Das Cholesterin gehört in diesem Zusammenhang zu den wichtigsten Steroiden, das vor allem als Ausgangsstoff der Sexualhormon-Bildung im Vordergrund steht.

In der Orthopädie gibt es keine operativen Eingriffe, die einen Zweiteingriff beinhalten, bei dem neu regenerierter Knochen zur Aufnahme eines Implantates entfernt werden muss. Daher kann das Behandlungsergebnis nur anhand von radiologischen Daten, klinisch standardisierten Schmerzskaleten und Lebensqualitätserfassungen der Patienten gemacht werden (Buchbinder et al., 2009, Morgan et al., 2014). In der Zahnmedizin hingegen muss für eine Implantatinserktion ein Implantatbett geschaffen werden und somit ein Teil des neugebildeten Knochens wieder entfernt werden. Dieser sonst verworfene Knochen kann somit ohne ethische Bedenken für histologische Untersuchungen genutzt werden, ohne den Patienten zu schaden und zusätzlich zu belasten.

In der Zahnmedizin ist vor allem im Bereich der Implantologie die Knochenregeneration ein zentrales Thema, das seit ca. 20 Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen ist. Um die Wünsche der Patienten nach feststehendem implantatgetragenen Zahnersatz zu erfüllen, muss ein Minimum an Kieferknochen vorhanden sein. Da besonders im Oberkiefer im Bereich der Kieferhöhlen das für eine Implantation nötige Knochenangebot nicht vorhanden ist, müssen mittels spezieller augmentativer Maßnahmen die Voraussetzungen für die Implantatinserktion geschaffen werden. Zu diesem Zweck werden in der Implantologie zunehmend

Knochenersatzmaterialien eingesetzt. Die Umsetzung in ein ausreichendes Knochenbett von mindestens 10 mm Höhe ist das Ziel der Sinusbodenaugmentation oder auch Sinusbodenelevation. Ob die Sexualhormone auch in diesem Bereich einen Effekt auf die Knochenregeneration ausüben, wird in der vorliegenden Studie untersucht.

1.1.1 Hypothese

Aus den o. g. Gründen ist es von besonderem Interesse, die Zusammenhänge zwischen Östrogen, Testosteron (freiem und gebundenem) und SHBG auf die Knochenneubildung beim Menschen näher zu untersuchen. Hierfür bietet es sich an, männliche und weibliche (prä- und postmenopausale) Patienten unterschiedlichen Alters im Rahmen eines regenerativen Eingriffes näher zu untersuchen.

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Studie geht davon aus, dass die Konzentrationen von Östrogen, Testosteron und SHBG einen regulativen Einfluss auf die knochenregenerativen Prozesse nach einer Sinusbodenelevation haben und sowohl Östrogen als auch Testosteron die Knochenneubildungsrate positiv beeinflussen, was anhand histomorphometrischer Daten zur Quantifizierung des neugebildeten Knochens und der Expression osteogener Differenzierungsmarker nachgewiesen werden kann. Die so gewonnenen klinischen Erkenntnisse könnten zur Optimierung der Planung einer Vielzahl von chirurgischen Eingriffen vom großen Nutzen sein, zum Beispiel im Sinne einer individualisierten Medizin. Eine Verkürzung der Knochenheilungsdauer würde eine Verkürzung der Therapiedauer und somit eine schnellere Versorgung mit dem definitiven Zahnersatz ermöglichen. Ferner könnte auch die Regeneration größerer Defekte durch Hormonsubstitutionen beschleunigt werden.

1.1.2 Studiendesign

Im Rahmen einer kontrollierten klinischen Studie wurden präimplantologisch bei Patienten mit einem Knochendefizit im Bereich der posterioren Maxilla Sinusbodenelevationen durchgeführt. Hierbei wurde als Augmentat ein Gemisch aus autologem Knochen des Tuber maxillae und einem β -TCP mit einer Porosität von 65 % in einem Verhältnis von 1:10 verwendet. Als synthetisches Knochenersatzmaterial kam in der Studie Ceros[®] (Mathys) zum Einsatz, welches klinisch etabliert sowie langjährig bewährt ist und dessen ausgezeichnete Biokompatibilität,

Osteokonduktivität und Knochenbindung in den klinisch–histologischen Studien von Bednarek (2011) und Stiller et al. (2014) auch für die Sinusbodenaugmentation belegt wurde.

Es wurde sechs Monate nach zweizeitiger Sinusbodenelevation im Rahmen der Implantation / Re-entry eine Biopsie aus dem knöchernen Regenerat entnommen und diese einer histomorphometrischen und immunhistochemischen Untersuchung zugeführt. Simultan mit der Implantation wurde eine Bestimmung von Östradiol, Testosteron und SHBG im Blutserum mittels Radioimmunoassay und Elektrochemolumineszenz-Immunoassay (ECLIA) durchgeführt.

Parallel mit den Probenentnahmen wurde bei den Patienten eine intensive Anamnese zur Erfassung der Ernährungsgewohnheiten und gynäkologischen Besonderheiten erhoben. Zusätzlich wurde über die Messung von Körpergröße und -gewicht der body mass index (BMI) errechnet.

Die zum Zeitpunkt der Implantatinserion aus dem präparierten Implantatbett mittels Trepanfräse entnommenen Biopsien wurden histomorphometrisch einerseits auf neu formierten Knochen und andererseits auf die Partikeldegradation des β -TCPs untersucht. Bei der vorliegenden Studie wurde so der hormonelle Einfluss auf die Knochenregeneration, d. h. die osteoblastische Zelldifferenzierung und die Reifung des Knochengewebes in vivo charakterisiert. Hierzu kamen etablierte Techniken des immunhistochemischen Nachweises osteogener Marker an unentkalkten Sägeschnitten nach Kunststoff (PMMA)-Einbettung zum Einsatz. Immunhistochemisch wurden nach dieser speziellen Kunststoffeinkbettung die Präparate auf die Expression von Kollagen Typ I (COL I), alkalischer Phosphatase (ALP), Osteocalcin (OC) und Bone Sialoprotein (BSP) untersucht (Knabe et al., 2006, 2008, Stiller et al., 2014). Sämtliche an den Knochenbiopsien ermittelten histomorphometrischen und immunhistochemischen Parameter wurden in Korrelation zu den gemessenen Konzentrationen an Östradiol und freiem sowie gebundenem Testosteron gebracht. Zusätzlich wurde der freie Androgenindex, d. h. das Verhältnis von Testosteron zu SHBG, ermittelt und sämtliche Parameter in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Gewicht und Rauchverhalten untersucht.

1.1.3 Fragestellung

Diese Studie befasste sich mit den Fragen, ob es zum einen geschlechts- und altersspezifische Unterschiede bei der Knochenregeneration gibt und zum anderen, welchen Einfluss der BMI in den Gruppen der Männer und Frauen auf die Knochenregeneration ausübt. Von Interesse war

außerdem die Frage, welchen Einfluss Nikotinabusus auf die Knochenregeneration hat. Alle diese Faktoren wurden im Zusammenhang mit den Sexualhormonen untersucht.

1.2 Sexualhormone

Der Aufbau der Sexualhormone basiert auf einer C-19-Steroidstruktur, deren Synthese aus Cholesterin erfolgt (Stoiber, 2007). Wie bereits erwähnt, haben Hormone neben der Regulierung der Fortpflanzung auch einen Einfluss auf diverse Organfunktionen und die Knochenbildung bzw. Frakturheilung. Dabei sind besonders Östrogen, Testosteron aber auch das SHBG von eminenter Bedeutung.

1.2.1 Testosteron

In dieser Studie stand das Testosteron als männliches Sexualhormon im Vordergrund. Testosteron ist im Serum zu ca. 60 % an SHBG und zu ca. 38 % an Albumin gebunden. Nur ca. 2 % liegen als freies Testosteron vor. Die Produktion des Testosterons aus Cholesterin findet hauptsächlich in den Leydig'schen Zellen der Hoden statt. In geringen Mengen wird Testosteron außerdem in der Nebennierenrinde und bei Frauen in den Eierstöcken produziert. Es beeinflusst die Entwicklung der Geschlechtsorgane und der sekundären Geschlechtsmerkmale. Im Folgenden findet eine Unterteilung in sexualspezifische und sexualunspezifische Wirkungen statt:

- | | |
|----------------------------|---|
| Sexualspezifische Wirkung: | <ul style="list-style-type: none">- Funktion der Geschlechtsdrüsen,- Reifung der Samenzellen (Spermiogenese und Spermatogenese),- Sekundäre männliche Geschlechtsmerkmale und- Libido. |
|----------------------------|---|

- Sexualunspezifische Wirkung:
- Knochenwachstum,
 - Wirkung auf Muskulatur, Haut, Talgdrüsen,
 - Stimulation der Hämatopoese und
 - Stoffwechselwirkung (anabole Wirkung).

Das Testosteron gehört zur Gruppe der Androgene, die der Gruppe der Steroidhormone untergeordnet ist und besteht aus drei 6-er und einem 5-er Kohlenstoffring. An dem C-17-Atom befindet sich die funktionelle Hydroxylgruppe (OH-Gruppe).

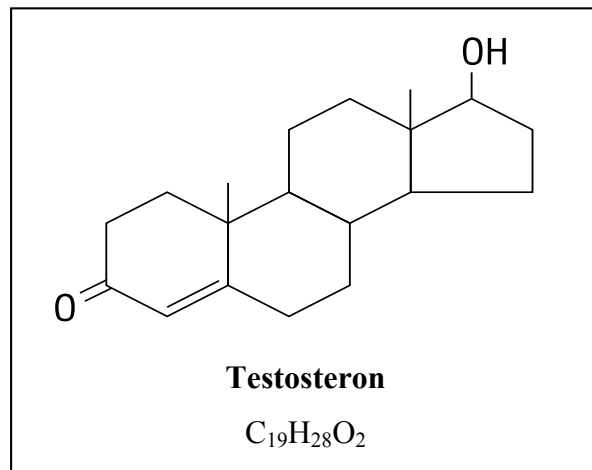


Abbildung 1: Struktur- und Summenformel des Testosterons (Löffler, 1993/94)

1.2.2 Östrogene

Zu der Gruppe der hauptsächlich weiblichen Sexualhormone gehören die Östrogene und Gestagene. Die wichtigsten Östrogene sind Östradiol, Estron und Estriol sowie als Gestagen das Progesteron. Die Produktion der Östrogene findet in den Follikeln der Ovarien, in geringen Mengen in der Nebennierenrinde, in der Brust, im Fettgewebe, während der Schwangerschaft in der Plazenta und bei den Männern in den Testes statt. Östrogene bzw. das Östradiol sind für die Ausbildung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale verantwortlich. Sie steuern die Geschlechtsentwicklung und den Genitalzyklus, beeinflussen das Wachstum der Gebärmutter Schleimhaut und verstärken in der Leber die Synthese der Gerinnungsfaktoren.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Knochenstabilisierung. Dabei wirken Östrogene genauso wie Testosteron stimulierend auf die Aktivität der Osteoblasten und hemmen die Osteoklasten (Riegel, 2009).

Wie aus dem Praxisalltag bekannt, erhöhen Östrogene ebenfalls die Gefäßpermeabilität, was oft zu Flüssigkeitseinlagerungen im Gewebe führt.

Im Rahmen dieser Studie wird der Einfluss von Östradiol als Vertreter der Östrogene auf die Knochenregeneration untersucht. Es hat eine besondere Bedeutung für die Knochenbildung, da es die höchste östrogene Aktivität besitzt.

Die Bildung des Östradiols findet in den Ovarien hauptsächlich in den Thekazellen der Graaf'schen Follikel und im Corpus Luteum statt. Die Umwandlung erfolgt dabei aus Testosteron in Östradiol durch Hydroxylierung der Methylgruppe am C-19-Atom und anschließender Aromatisierung des A-Ringes.

Das Östradiol gehört zur Gruppe der Steroidhormone und besteht aus drei 6-er, einem 5-er Kohlenstoffring und zwei funktionellen OH-Gruppen.

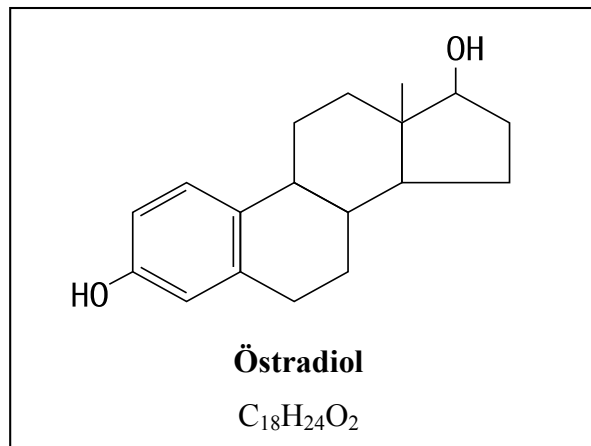
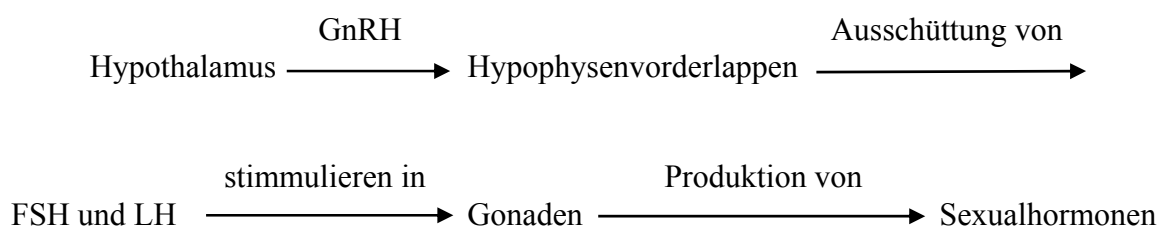


Abbildung 2: Struktur- und Summenformel des Östradiols (Löffler, 1993/94)

1.2.3 Entstehung von Testosteron und Östradiol aus Cholesterin

Die Produktion der Sexualhormone wird im Hypothalamus durch das Gonaden-Releasing-Hormon (GnRH) induziert. Durch dessen Wirken wird im Hypophysenvorderlappen die Ausschüttung des Follikel stimulierenden Hormons (FSH, Follitropin) und des Luteinisierungshormones (LH, Lutropin) induziert. FSH und LH sind geschlechtsunspezifische Sexualhormone, sogenannte Gonadotropine, die nun in den Gonaden die Sexualhormonbildung stimulieren (Löffler, 1993 und 1994).



Die Umwandlung des Cholesterins in den Gonaden in die Steroidhormone Testosteron und Östradiol wird im Folgenden schematisch dargestellt (Löffler, 1993 und 1994).

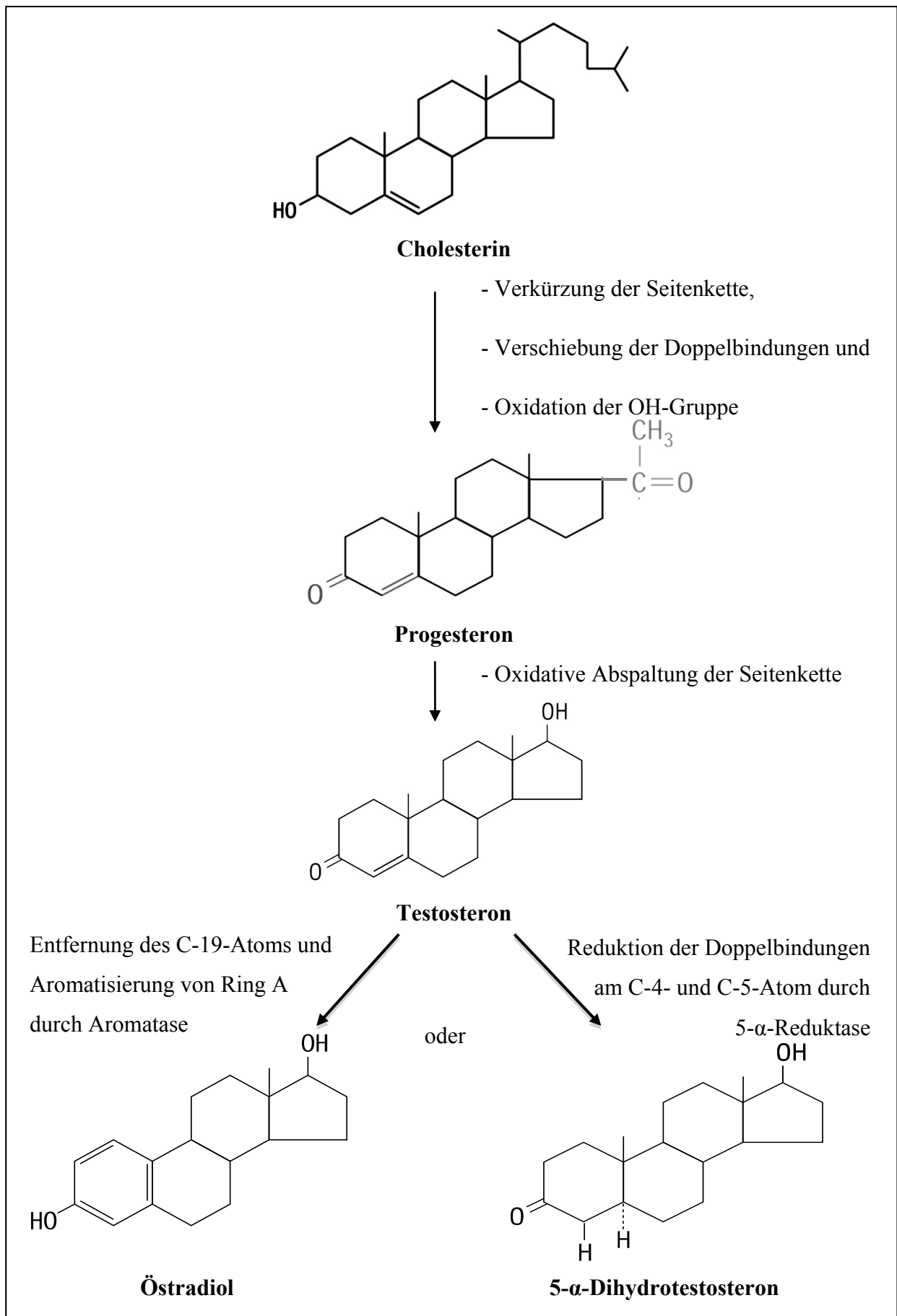


Abbildung 3: Biosynthese der Sexualhormone aus Cholesterin (Löffler, 1993/94)

1.2.4 Sexalhormon bindendes Globulin (SHBG)

SHBG liegt in biologischen Flüssigkeiten als homodimeres Glykoprotein vor, dessen Monomere sich aus zwei Laminin-G-ähnlichen Domänen zusammensetzen (Grishkovskaya et al., 2002). Es wird in der Leber produziert und dann ins Blut transportiert. Dort bindet es Testosteron und Östradiol, so dass diese ihre Zielorgane nicht mehr erreichen und damit dort auch nicht wirken können. Nur die ungebundenen Hormone erreichen die Zielorgane.

Es ist schon lange aus dem endokrinologischen Praxisalltag bekannt, dass ein erhöhter BMI oft mit erhöhten SHBG-Werten korreliert, wobei zu beachten ist, dass bei adipösen Patienten die SHBG Werte sinken (Schapira et al., 1991 und Selva et al., 2007).

1.2.5 Freier Androgenindex (FAI)

Testosteron ist beim Mann zu 98 % und bei der Frau zu 99 % an SHBG bzw. Albumin gebunden (Neumann et al., 1992).

Das von Albumin leicht zu lösende Testosteron und das freie Testosteron werden auch als biologisch verfügbares Testosteron bezeichnet (Porst, 2000). Repräsentativ für diese Fraktion kann entweder das freie Testosteron direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung des Gesamt-Testosterons zu SHBG geschätzt oder auch über eine Formel berechnet werden, was als freier Androgenindex bezeichnet wird.

Der freie Androgenindex (FAI) wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{FAI} = \frac{\text{Testosteron gesamt nmol/l} \cdot 3,47}{\text{SHBG nmol/l} \cdot 100}$$

1.3 Knochenzellen und Remodeling

Die Knochenzellen, zu denen die Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten gehören, haben einen regulatorischen Einfluss auf die Knochenhomöostase. Sie sind sowohl bedeutsam für den Auf- und Abbau des Knochens als auch für die Frakturheilung. In dem Abschnitt Remodeling (1.3.4) wird der ständige Knochenumbau genauer beschrieben.

1.3.1 Osteozyten

Den Hauptzellbestandteil ausgereiften Knochens bilden die Osteozyten. Sie sind zuständig für den Austausch von organischen und anorganischen Stoffen im Knocheninneren. In den Lakunen liegend und von mineralisiertem Zwischengewebe umgeben sind sie über Anastomosen und Kanalikuli miteinander verbunden. Durch diese interzelluläre Kommunikation können sie auf mechanische Reize reagieren und die Knochenformation und -resorption beeinflussen.

1.3.2 Osteoblasten

Die Osteoblasten entstehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen, die sich aus mesodermalen Keimbahnzellen entwickeln (Aubin, 2001). Die Osteoblasten sezernieren organische Knochenmatrix (unmineralisiertes Osteoid), welche zum größten Teil aus Kollagen Typ 1, Alkalischer Phosphatase und den weiter unten im Abschnitt 1.3.4 Remodeling aufgeführten, nicht kollagenen Knochenmatrixproteinen besteht. Durch Anlagerung von Hydroxylapatitkristallen an diese organische Matrix bildet sich die mineralisierte Knochensubstanz (Mundy, 1996 und Schinke et al., 1999).

Die Osteoblasten können zu Osteozyten bzw. bone-lining cells umgewandelt werden, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Es wird angenommen, dass sie eine Rolle in der Aktivierung des Prozesses des Knochenremodelings spielen (Bord et al., 1996).

1.3.3 Osteoklasten

Osteoklasten entstehen durch die Fusion hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Scheven et al., 1986 und Kurihara et al., 1989). Sie haften mit ihrer gefalteten Membran (ruffled border) an der Knochenoberfläche und sezernieren dort proteolytische Enzyme, Salzsäure und Wasserstoffionen, wodurch sie das Knochenmineral auflösen.

Die Aktivität der Osteoklasten wird unter anderem dadurch beeinflusst, dass die Zytokine Interleukin 1, Tumornekrosefaktor-Alpha und Monozytenkolonien-stimulierender Faktor einen Rückgang der Osteoklastenapoptose bewirken (Suda et al., 1997) und damit die Lebensdauer der Osteoklasten verlängern. Im Gegensatz dazu steigert Östrogen die Apoptoserate der Osteoklasten (Hughes et al., 1996) und wirkt auf diese Art knochenprotektiv.

1.3.4 Remodeling

Das Remodeling beschreibt den Prozess des ständigen Knochenumbaus, bei dem der Knochen sich an aktuelle funktionelle Belastungen anpasst (Gesicki, 2005). Häufig belasteter Knochen wird dabei verstärkt und weniger belasteter Knochen abgebaut. Dabei sind Osteoblasten für den Knochenaufbau und Osteoklasten für den Knochenabbau verantwortlich (Gesicki, 2005).

Der Remodelingprozess wird in fünf Phasen unterteilt: in die Aktivierungs-, Resorptions-, Formations-, Mineralisations- und in die Ruhephase.

In der Aktivierungsphase fusionieren aus den Vorläuferzellen die Osteoklasten, die dann in der Resorptionsphase den Knochen auflösen. Während der anschließenden Formationsphase finden die Differenzierung der Osteoblasten und die Sekretion der organischen Knochengrundsubstanz statt. Diese besteht sowohl aus Kollagen 1 (COL I) als auch alkalischer Phosphatase (ALP) und nicht kollagenen Knochenmatrixproteinen wie Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OC), Bone Sialoprotein (BSP) und Osteonectin (ON) (Owen et al., 1990, Aubin, 1998, Franceschi, 1999, Aubin, 2000, Sodek und Cheifetz 2000). Zur Mineralisierung und somit Verknöcherung des Osteoids kommt es in der Mineralisationsphase. Zum Abschluss werden in der Ruhephase alle Zellaktivitäten verringert.

Ein ganzer Zyklus dauert ca. 4-5 Monate, wovon die Resorptionsphase 3-4 Wochen anhält und die Formation erst 3 Monate danach weitgehend abgeschlossen ist (Delling et al., 1992).

Im Rahmen der Osteogenese wird zwischen einer desmalen und chondralen Ossifikation unterschieden. Bei der desmalen Ossifikation differenzieren sich Mesenchymzellen zu Osteoblasten, die die Knochenmatrixbildung aktivieren. Die Knochen des Schädels und des Gesichtsschädels, somit auch die Kieferhöhle, sowie das Schlüsselbein sind Beispiele für die desmale Ossifikation (Lüllmann-Rauch, 2006).

Bei der chondralen Ossifikation wird zunächst durch Chondroblasten ein Knorpelgerüst gebildet, in dem durch Aktivierung von Chondroblasten Hohlräume entstehen. Die anschließende Einwanderung von Mesenchymzellen und Osteoblasten in diese Hohlräume führt zu einer Verknöcherung des Knorpelgerüsts. Die chondrale Ossifikation findet überwiegend bei sekundären Frakturheilungen statt (Hipp, 2012) und bei der Bildung der Röhrenknochen während der Embryogenese.

1.4 Wirkung der Androgene und Östrogene auf den Knochen

Durch ihre Eigenschaft, den Knochenverlust zu verhindern, haben Sexualhormone als Medikation zur Osteoporoseprophylaxe (Niethard, 2003) große klinische Bedeutung und werden im klinischen Alltag als Medikation gegen postmenopausalen Knochenverlust weltweit genutzt.

Wie alle Hormone, wirken sowohl Östrogen als auch Testosteron über bestimmte Rezeptoren an den Zielorganen. Im Knochen sind die wichtigsten Rezeptorsubtypen für das Östrogen der Östrogen-Rezeptor-alpha (ER- α), der erstmals 1986 entdeckt wurde (Green et al., 1986), und der Östrogen-Rezeptor-beta (ER- β), welcher erst zu einem späteren Zeitpunkt beschrieben wurde (Kuiper et al., 1996). An diese zwei Rezeptoren binden neben dem Östrogen verschiedene Gewebs- und Zellliganden. ER- β kommt gehäuft in Knochen, Knochenmark, Niere, Lunge und Granulosazellen vor (Enmark et al., 1997). Der ER- α hingegen zu einem Großteil im Knochen, Endometrium, im ovariellen Stroma, Hoden, Leber, Niere, Hypophysenvorderlappen und in Brustkrebszellen (Jockelhövel, 2003). Die Rezeptoren sind auch in wichtigen Knochenzellen wie Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten nachweisbar.

Sims et al. (2002) stellten eine Studie vor, bei der die Wichtigkeit von ER- α bei der Knochenmodellation hervorgehoben wurde. Der Prozess der Modellation trägt überwiegend in den ersten zwei Dekaden des Lebens, im Gegensatz zum Remodeling, zum Wachstum bzw. zur Formveränderung des Knochens bei. Die Autoren bedienten sich eines Defizienzmodells, indem sie ER- α vollständig entfernten. Dabei kam es zu einem Abfall im Knochenumbau und interessanterweise einem Anstieg des trabekulären Knochenvolumens bei männlichen und weiblichen Mäusen.

Bei der Deletion von ER- β bei männlichen Mäusen konnte keine positive oder negative Reaktion auf den Knochenumbau festgestellt werden. Bei den weiblichen Tieren hingegen kam es zu einem Abfall der Knochenresorption bei ebenfalls gleichzeitigem Anstieg des trabekulären Knochenvolumens (Sims et al., 2002).

Bei der Deletion beider Rezeptoren bei den Weibchen kam es zu einem starken Abfall des trabekulären Knochenvolumens und gleichzeitigem Rückgang des Knochenumbaus (Sims et al., 2002). Daraus leiteten Sims et al. ab, dass das Fehlen von ER- α und den damit fehlenden Bindungsmöglichkeiten, zu einem stärkeren Unterschied an zirkulierendem Östradiol und Testosteron führt und somit einen Einfluss auf das Remodeling und die Knochenmasse ausübt (Sims et al., 2002). Bezogen auf das Geschlecht ist bei den Männchen nur ER- α für den

Knochenumbau wichtig und bei den Weibchen jedoch sowohl ER- α als auch ER- β , da hier beide Rezeptoren jeweils das Fehlen des anderen Rezeptors kompensieren können.

Zur Wirkung des Testosterons auf die Knochenmodellation ist hingegen nicht viel bekannt. Man hat aber herausgefunden, dass Testosteron indirekt auch durch Aromatisierung von Testosteron zu Östradiol hemmend auf die Knochenresorption wirkt (Falahati-Nini et al., 2000). Ebenso senkt es wie Östrogen die IL-6 Produktion und damit auch wieder die Knochenresorption.

Durch Testosteron wird die Lebensdauer der Osteoblasten und die der Osteoklasten negativ beeinflusst (Manolagas, 2000). Ferner wird für Testosteron auch ein leicht positiver Effekt auf die Osteoblastenproliferation beschrieben (Kasperk et al., 1989). Somit hat Testosteron einen insgesamt positiven Einfluss auf die Steigerung der Knochenmasse.

Osteoblasten und Osteoklasten besitzen hoch affine Androgenrezeptoren, die erstmals 1988 entdeckt wurden (Chang et al., 1988 und Lubhan et al., 1988). Die Studie von Abu et al. (1997) beschreibt das Vorkommen der Androgenrezeptoren in Osteoblasten, Osteozyten, Chondrozyten, mononukleären Zellen und im Endothel der Blutgefäße des Knochenmarks. Die Affinität von Testosteron und Dihydrotestosteron zu Androgenrezeptoren scheint ebenfalls eine Rolle zu spielen (Benz et al., 1991). Die Frage, ob bei männlichen Individuen das Testosteron allein schon einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat oder ob hier eher die Konvertierung zu Östrogenen im Vordergrund steht und so den Einfluss auf den Knochenstoffwechsel verstärkt, wurde bis jetzt noch nicht ausreichend beantwortet.

Die von Kasperk untersuchten Androgene zeigten eine die Knochenresorption hemmende Wirkung (Kasperk et al., 1997). Durch die gehemmte Reifung von osteoklastären Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten bewirken Östrogene eine Reduktion der Knochenresorption (Pacifci, 1996). Wie zuvor bereits erwähnt, wird auch die Sekretion von resorptionsstimulierenden Zytokinen, z. B. Interleukin 1 und 6, gehemmt (Jilka et al., 1992). Östrogene und Androgene fördern den Osteoklastenstoffwechsel durch direkte positive Wirkungen auf die Wachstumsfaktoren (z. B. TGF-beta, IGF und FGF) der Osteoblasten und deren Rezeptorexpressionen (Fiene, 2010). Damit wirken sowohl Androgene als auch Östrogene positiv auf den Knochenaufbau.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Östrogene und Testosteron zwei der wichtigsten Bausteine für die Knochenhomöostase sind. Obwohl ihre Beteiligung an dem

Knochenremodeling in der Medizin bekannt ist, findet man kaum Studien, die die Wirkungen der Sexualhormone auf die Knochenhomöostase beim Menschen fundiert beschreiben.

1.4.1 Altersbedingte Veränderungen

Altersbedingte Veränderungen des Hormonhaushaltes, vor allem das der Sexualhormone, können sowohl bei postmenopausalen Frauen als auch bei älteren Männern negative Auswirkungen auf Stoffwechselvorgänge haben (Debrunner, 1994, Niethard et al., 2003, Riede et al., 2004). Verdeutlicht wurde das in der orthopädischen sowie chirurgischen Literatur durch die Annäherung der Inzidenz altersbedingter Hüft- und Wirbelkörperfrakturen bei Männern mit 50 % an die der alternden Frauen (Riggs et al., 1995). Dies tritt jedoch bei Männern eine Lebensdekade später ein. Seit einer Reihe von Jahren wird das Problem der Osteoporose bei Männern als ein stetig wachsendes gesundheitliches Problem von der Fachwelt betrachtet (Cauley et al., 2010, Ho-Pham, 2013).

Bei Frauen in der perimenopausalen Periode versiegt die Hormonproduktion in den Ovarien, so dass ab dieser Zeit das Östrogen hauptsächlich über die Aromatisierungsreaktion des Testosterons zu Östradiol hergestellt wird. Als gesicherte Aussage gilt, dass der stetige Verlust von Sexualhormonen zu einem wachsenden Verlust an Knochenmasse, sowohl bei postmenopausalen Frauen, als auch bei älteren Männern führt (Riggs et al., 1998).

1.4.2 Mutationsbedingte Veränderungen

Drei Studien versuchten die Frage zu beantworten, ob das Testosteron direkt oder eher indirekt durch Aromatisierung in Östradiol einen positiven Effekt auf die Knochenbildung hat. Die Arbeitsgruppe um Smith et al. (1994) berichtet über einen Mann mit Mutation im Östrogen Rezeptor Gen (ER-Gen). Trotz normaler Testosteron-Serumwerte, lagen bei diesem Patienten eine Osteoporose, nicht geschlossene Epiphysenfugen und eine fehlende Gewebsreaktion auf eine Östrogen Therapie vor. Die nächsten zwei Studien beschreiben zwei Männer und eine Frau mit einer Mutation im Aromatase-Gen, welches für die Metabolisierung von Testosteron zu Östradiol unabdingbar ist (Morishima et al., 1995 und Carani et al., 1997). Bei allen drei Patienten konnte eine Osteopenie (eine verringerte Knochendichte) sowie ein verzögerter Epiphysensverschluss beobachtet werden. Morisihima (1995) untersuchte in seiner Studie ein

Geschwisterpaar (Bruder und Schwester), die beide erhöhte Testosteronwerte und sehr geringe Östrogenwerte hatten. Der in der Studie von Carani (1997) vorgestellte Patient wurde trotz normaler Testosteronwerte zunächst zusätzlich mit Testosteron behandelt und zeigte keine Verbesserung hinsichtlich der Knochendichtewerte. Erst eine Östrogentherapie führte zum Erfolg bezüglich der Knochenreifung bzw. des Knochenumbaus. Trotz der normalen bzw. erhöhten Testosteronwerte zeigte lediglich die Östrogentherapie bei allen Patienten dieser Studien eine Erhöhung der Knochendichte und eine Normalisierung des Knochenumbaus. Daraus lässt sich ableiten, dass das Testosteron im Vergleich zu Östrogen beim Menschen nur einen geringen Effekt auf die Knochenbildung hat. Denn nur die Therapie mit zusätzlichem Östrogen führte zur Erhöhung der Knochendichte und der Normalisierung des Knochenumbaus.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenauswahl und Einteilung

Die Studie umfasst 60 männliche und 60 weibliche Patienten einer Praxis für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, bei denen von einem Operateur eine zweizeitige Sinusbodenelevation mit anschließender Implantation durchgeführt wurde. Das Alter der Patienten lag zwischen 25 und 84 Jahren. Alle Patienten mussten zunächst einen Anamnesebogen ausfüllen, um eventuell vorhandene Erkrankungen, Medikamenteneinnahmen, Allergien und diverse anamnestisch wichtige Aussagen, die im Folgenden genannt werden, zu erfassen.

Anamnestisch erfasst wurden Geschlecht, Alter, Gewicht, Körpergröße, Medikation, Erkrankungen, Hormon- und Vitaminsubstitution, operative Eingriffe, sportliche Aktivität, Nikotin- und Alkoholkonsum, elterliche Anamnese und Menopause.

Aus den Angaben zum Gewicht und der Körpergröße wurde der BMI errechnet. Über den BMI und die korrespondierenden histologischen Ergebnisse wurde dann ermittelt, ob Über- bzw. Untergewicht einen Einfluss auf die Knochenregeneration haben. Bei der Klassifikation des BMI wird laut WHO bei einem BMI bis 18,5 von Untergewicht und ab einem BMI von 25 von Übergewicht gesprochen. Aus Praktikabilitätsgründen wurde in dieser Studie noch der BMI verwendet. In jüngster Zeit wird dieser aber wegen konstitutioneller Umstände kritisch diskutiert.

Die Formel des BMI lautet:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Gewicht in kg}}{(\text{Körpergröße in m})^2}.$$

Die Menopause und eventuelle Hormonsubstitutionen, sowohl bei Männern als auch bei Frauen, waren weitere Aspekte, um den Einfluss des Hormonhaushaltes bzw. der Hormontherapie auf die knöcherne Regeneration zu beurteilen. Ob, wie aus dem Praxisalltag bekannt, Vitamine wie zum Beispiel Vitamin D oder Vitamin C oder auch sportliche Aktivitäten positive Wirkungen und der Nikotinkonsum eventuell eine negative Wirkung auf den Knochen haben, wurde in die Auswertung mit einbezogen. All diese Parameter wurden in den statistischen Analysen berücksichtigt.

Bis auf allgemeine und lokale Kontraindikationen der Sinusbodenelevation sowie Bedingungen, die beim Re-entry einer Knochengewinnung entgegen stehen, gab es keine weiteren Kriterien zum Ausschluss der Patienten aus der Studie. Zentrales Eingangskriterium für die Erfassung der Patienten dieser Studie war eine Mindestbreite des Alveolarfortsatzes von 6 mm, um die Entnahme des Knochenbioptates zu ermöglichen. Patienten mit einem schmalen Alveolarfortsatz wurden in die Studie nicht einbezogen. Des Weiteren wurden nur solche Patienten in die Studie inkludiert, die einen intakten Biopsiezylinder mit augmentiertem Volumen über eine Mindestlänge von 7 mm aufwiesen. Alle Patienten wurden von einem Chirurgen mit langjähriger Berufserfahrung ärztlich und zahnärztlich untersucht und behandelt. Die Patienten wurden über den OP-Verlauf der Sinusbodenelevation, das zu benutzende Knochenersatzmaterial Ceros[®] und die spätere Implantation mit vorheriger Biopsie und Blutabnahme aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zu der Studie. Die Studie wurde von der Freiburger Ethik-Kommission-International (feki Code: 013/1294) genehmigt.

2.1.1 Befund, Diagnose und Therapieplanung

Nach klinischer Untersuchung, eingehender Beratung der Patienten, Anfertigung einer Panoramaschichtaufnahme und bei Bedarf dem Erstellen einer digitalen Volumentomographie wurde die Indikation für die Sinusbodenelevation sowie implantatprothetische Rehabilitation gestellt. Alle Patienten wurden über ein zweizeitiges Verfahren der Sinusbodenelevation unter Verwendung eines β -TCP-Knochenersatzmaterials und Eigenknochen aufgeklärt und behandelt. Bedingt durch das vorhandene Knochendefizit war bei allen in der Studie inkludierten Patienten ein einzeitiges Verfahren mit gleichzeitiger Augmentation des β -TCPs und Implantation nicht möglich. Bei allen Patienten wurde daher zunächst eine Sinusbodenelevation bzw. –augmentation durchgeführt. Sechs Monate später erfolgte die Implantatinserterion mit vorheriger Knochenbiopsie aus der prospektiven Implantatkavität und Venenpunktion 5 ml Blut am gleichen Tag zwischen acht und zehn Uhr. Die Bestimmung der Serumkonzentrationen von Testosteron, freiem Testosteron, Östradiol, Sexualhormon bindendem Globulin (SHBG) und freiem Androgenindex wurde in einem kommerziellen Labor¹ für Medizinische Diagnostik (Labor 28) durchgeführt. Die Konzentrationen von Östradiol und SHBG wurden mittels eines Elektrochemolumineszenz-Immunoassay (ECLIA) Kit (Roche AG, Schweiz) und von

¹ Labor 28 AG, Mecklenburgische Straße 28, 14197 Berlin

Testosteron durch Radioimmunoassay (RIA) (Siemens Inc., Deutschland) gemessen. Für Östradiol betrugen die Intra- und Interassayvariationskoeffizienten 4,72 % bzw. 3,76 % bei 100 pg/ml. Für Testosteron betrugen die Intra- und Interassayvariationskoeffizienten 2,91 % bzw. 4,94 % bei 5 ng/ml. Für das freie Testosteron betrugen die Intra- und Interassayvariationskoeffizienten 8,87 % bzw. 7,67 % bei 2,5 pg/ml. Der freie Androgenindex wurde wie folgt berechnet: Testosteron (ng/ml) x 3,47 dividiert durch SHBG x 100.

Die Knochenbiopsien wurden intraoperativ in die Fixierungslösung getan und in der Abteilung für Experimentelle Zahnmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin histomorphometrisch vermessen und immunhistologisch ausgewertet. Der Prozess der Verarbeitung und Vermessung wird im Abschnitt 2.3 genauer beschrieben.

Tabelle I: Normwerte der Hormone

	Normwerte Frauen	Normwerte Männer
Östradiol in pg/ml	12,5-498	7,0-43
Östradiol in der Follikelphase in pg/ml	12,5-166	/
Östradiol in der Ovulationsphase in pg/ml	85-498	/
Östradiol in der Lutealphase in pg/ml	43,8-211	/
Östradiol postmenopausal in pg/ml	5-54,7	/
Freies Testosteron in pg/ml	< 1,55	8,80-27

	Normwerte Frauen	Normwerte Männer
Testosteron in ng/ml	0,06-0,82	2,80-8
SHBG in nmol/l	26,1-110	14,5-48,4
SHBG in nmol/l postmenopausal	14,1-68,9	/
Freier Androgenindex	< 5,9	> 15,5

2.1.2 Bildgebende diagnostische Verfahren

Bei allen Patienten wurde präoperativ eine Panoramaschichtaufnahme zur genauen Darstellung und Beurteilung des Sinusbodens, des Knochenangebotes, des Ausschlusses pathologischer Prozesse, der Darstellung des ostiomeatalen Komplexes und der Kieferhöhlenbinnenstruktur angefertigt. Bei Bedarf wurde zusätzlich eine digitale Volumentomographie erstellt. Nach sechs Monaten wurde während der Implantation eine Messaufnahme und nach Implantation eine Kontrollaufnahme (Panoramaschichtaufnahme) angefertigt.

2.1.3 Operativer Verlauf der Sinusbodenelevation

Die Sinusbodenaugmentation wurde unter Gabe von Lokalanästhetika durchgeführt. Um ein entsprechendes Knochenlager zu schaffen, wurde bei der Operation zunächst von lateral ein ovales Knochenfenster als Zugang zum Sinus maxillaris präpariert. Nach Anheben der Schneider'schen Membran, wurde der so dargestellte Hohlraum mit einem Gemisch eines β -TCP Knochenersatzmaterials und Spänen von Eigenknochen in einem Verhältnis von etwa 10:1 aufgefüllt. Die Eigenknochenspäne wurden mit Hilfe einer Knochenhohlmeißelzange im Bereich der Tuber maxillae gewonnen. Das Gemisch aus Knochenersatzmaterial und den fein zerkleinerten Knochenspänen wurde mit venösem Eigenblut des Patienten vermischt, nach Einbringung in den dafür vorgesehenen Hohlraum mit einer Kollagenmembran (Collprotect, Botiss, Berlin, Deutschland) abgedeckt und die Wunde verschlossen. Zum Abschluss erhielt der

Patient folgende Medikamente, um eventuelle Entzündungen und daraus resultierenden Komplikationen vorzubeugen:

- Clindamycin (Clindamycin Ratiopharm® 600mg, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) 1200 mg oral pro Tag als Antibiotikum für sieben Tage,
- Ibuprofen (IBU-Ratiopharm® 400mg, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) als Analgetikum 800-1200 mg oral gegen Schwellungen und Schmerzen,
- intravenös 250 mg Cortison (Solu-Decortin®, Merck, Darmstadt, Deutschland) und
- Lokale Applikation bzw. Injektion von 1 ml Dexamethasone (Dexabene 4mg/ml, Merckle-Recordati KGaA, Darmstadt, Deutschland) zur Vermeidung der Schwellung der Schneider'schen Membran und dadurch bedingten postoperativen Druck auf das Knochenersatzmaterial.

2.1.4 Biopsiegewinnung und Implantatsetzung

Sechs Monate nach Einheilung des Augmentationsmaterials, wurde am Tag der Implantation nach Injektion eines Lokalanästhetikums durch eine mesiale Entlastung ein Mukoperiostlappen abpräpariert und die Biopsie exakt am Ort der vorgesehenen Implantation entnommen. Die Entnahme erfolgte mit Hilfe eines Trepanbohrers (Straumann GmbH, Freiburg, Deutschland) unter permanenter Kühlung mit einer physiologischen Kochsalzlösung. Der äußere Durchmesser des Trepanbohrers betrug 3,5 mm, der innere Durchmesser des Trepanbohrers 2,75 mm, woraus der Biopsiedurchmesser resultierte. Die Biopsien hatten eine Länge von bis zu 10 mm je nach mechanischer Stabilität des Regenerates. Nach Entnahme der Knochenbiopsie und weiterer vollständiger Aufbereitung des Implantatbettes auf einen Durchmesser des geplanten Implantates, wurde ein Schraubenimplantat in das Implantatbett inseriert und mit einer Deckschraube versehen. Die Implantate heilten submukosal für 6 Monate ein. Es wurden folgende Implantationssysteme benutzt:

- Camlog® (Altatec, Wimsheim, Deutschland),
- Ankylos® (Dentsply Friadent, Mannheim, Deutschland) und
- ITI® (Straumann, Basel, Schweiz).

2.2 Verwendetes Knochenersatzmaterial

Ceros[®] wurde als Knochenersatzmaterial eingesetzt. Die folgenden Erläuterungen des Materials sind nach Angaben des Herstellers zusammengefasst.

2.2.1 Material

Ceros[®] ist ein phasenreines β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) mit einer Phasenreinheit von über 95%. Laut Angaben des Herstellers, liegt die tatsächlich erreichte Phasenreinheit durchschnittlich bei > 98 %. Die Herstellung erfolgt durch einen Hochtemperaturesinterprozeß unter Verwendung von Temperaturen von über 1100 °C. Bei diesem Verfahren werden Keramiken gebildet, deren Partikel über größere Sinterhalse miteinander verbunden sind (Helf, 2009). Sinterhalse entstehen durch Diffusion der Pulverteilchen an der Oberfläche.

2.2.2 Charakteristika

Ceros[®] ist eine poröse β -TCP Keramik mit osteokonduktiver Eigenschaft, durch die die Bildung von neuem Knochen angeregt wird. In der vorliegenden Studie wurde für den Knochenaufbau Ceros[®] in der Korngröße 0,7-1,4 mm verwendet. Die synthetische Herstellung im Hochtemperaturesinterprozess garantiert sowohl konstante Porosität und Porengröße als auch die Phasenreinheit und Keimfreiheit des Materials.

2.2.3 Morphologie

Das Granulat verfügt über ein interkonnektierendes Porensystem aus Mikro- und Makroporen. Die Porosität von Ceros[®] beträgt 65 %. Der Anteil der Makroporen mit einer Größe von 100-500 μm liegt bei 95 %. Die Mikroporen haben einen Anteil von 5 % bei einer Größe von < 10 μm und dient der Vergrößerung der Oberfläche. Die Größe und Verteilung der Makro- sowie der interkonnektierenden Poren begünstigt das Einwachsen von Blutgefäßen und Knochen.

2.3 Histologie, Histomorphometrie und Immunhistologie

2.3.1 Aufbereitung der Proben

Die Biopsien wurden für 1 Woche bei Raumtemperatur in HistoCHOICE[®] (Amresco, Solon, Ohio, USA) fixiert. Die Weiterverarbeitung erfolgte, wie nachfolgend beschrieben, entsprechend dem publizierten Verfahren von Knabe et al. (2006). Bei diesem Verfahren ist eine immunhistologische Untersuchung von unentkalkten Schnitten möglich.

Nach anschließendem, zweitägigem Entwässern der Biopsien in Azeton mit 5 % Polyethylenglykol 400 (PEG 400, Merck, Darmstadt, Deutschland) bei -20 °C wurden die Proben nacheinander für jeweils drei Stunden in reines Azeton, in Methylbenzoat und Xylol gestellt, wobei die Infiltration mit Azeton und Methylbenzoat im Kühlschrank stattfand, die Infiltration mit Xylol jedoch bei Raumtemperatur. In einem Verhältnis von 40:60:2 wurden die Proben dann mit einer Lösung aus destabilisiertem Methylmethacrylat (MMA) (Merck, Darmstadt, Deutschland), destabilisiertem Butylmethacrylat (BMA) (Merck, Darmstadt, Deutschland) und PEG 400 für die Dauer von drei Tagen bei Raumtemperatur infiltriert. Die Destabilisierung der Methacrylate wurde über eine Inkubation mit 12 % Aluminiumoxid 90 aktiv basisch (Merck, Darmstadt, Deutschland) erreicht.

Das Einbettmedium wurde aus zwei Stammlösungen hergestellt. Stammlösung A enthielt destabilisiertes MMA mit 2 % Benzoylperoxid (BPO) als Katalysator (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Stammlösung B destabilisiertes BMA mit 2 % PEG 400 und 1 % N,N-Dimethyl-p-Toluidin (Merck, Darmstadt, Deutschland). Diese Stammlösungen wurden direkt vor der Einbettung im Verhältnis 2:3 (A:B) gemischt und mit der Probe in Polyethylenbehälter zur Aushärtung gegeben. Die Dauer der Polymerisation der Proben dauerte bis zu einem Tag und erfolgte bei +4 °C.

Das gewählte Einbettmedium ermöglichte nicht nur die immunhistologische Untersuchung der Sägeschnitte, da durch dieses Verfahren die Antigenität erhalten bleibt, sondern auch die im Vorfeld nötige Herstellung von Sägeschnitten mit 30 µm Dicke.

Nach dem Entfernen der Überschüsse des Einbettmaterials von den auspolymerisierten Proben wurden diese mit Technovit 3040 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) auf einen Probenträger geklebt. Die dann in das Sägemikrotom Leitz 1600 (Leitz, Wetzlar, Deutschland) eingespannte Probe wurde in der gewünschten Ebene angeschnitten und anschließend um die gewünschte Schnittdicke zuzüglich der Sägeblattstärke weiter hochgestellt. Der

Acrylobjektträger (Plexiglas GS209) (Röhm, Darmstadt, Deutschland) wurde mittels eines Zweikomponentenklebers aus Epoxidharz (UHU, Bühl, Deutschland) aufgeklebt. Nach Aushärten des Klebers konnte der Schnitt gesägt und anschließend mit Schleifpapieren der Körnungen 1200 und 4000 (Schleifsystem Exakt 400 CS, Exakt, Norderstedt, Deutschland) geschliffen und poliert werden.

2.3.2 Immunhistochemische Färbung

Die visuelle Darstellung der Antigene, die im Laufe der Knochenregeneration exprimiert wurden, beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion.

Zunächst wurden die Schnitte in Toluol (2 x 20 Min), in Xylol (2 x 20 Min) und in Azeton (1 x 10 Min) entplastet, um die Antigene vom Kunststoff zu befreien. Anschließend wurden sie mit destilliertem Wasser abgespült und um eine Austrocknung zu vermeiden bis zur Färbung in TRIS-Puffer bei pH 7,4 aufbewahrt.

Jede Probe wurde mit dem Dako Pen (Dako, Glostrup, Dänemark) umrandet, so dass das Volumen der aufgetragenen Reagenzien auf der Probe verblieb. Die Proben wurden anschließend für 20 Min mit 2 % bovinem Serumalbumin (BSA) (Sigma, St. Louis, USA) in Dako antibody diluent (Dako, Glostrup, Dänemark) inkubiert und dreimal mit TRIS-Puffer für jeweils zwei Minuten gespült, um unspezifische Reaktionen zu verhindern.

Die Blockierung der körpereigenen Peroxidase wurde durch eine zehnminütige Behandlung mit der peroxidase enzyme blocking solution (Dako, Glostrup, Dänemark) gewährleistet.

Zur Markierung der Schnitte wurde zuerst für 30 Min ein primärer Antikörper für das jeweils nachzuweisende Antigen aufgebracht. Der nach 3-maligem 2-minütigem Spülen mit TRIS-Puffer daran bindende sekundäre Antikörper, der ebenfalls für 30 Min auf dem Schnitt verblieb, war mit Peroxidase konjugiert. Nach einem weiteren Spül-Schritt mit TRIS wurde die 3-Amino-9-Ethylcarbazole Plus Substrat-Chromogen solution (Dako, Glostrup, Dänemark) für 5-7 Min zur Farbentwicklung aufgetragen. In der nun stattfindenden Peroxidase-Reaktion konnte durch freierwerdende Protonen das farblose Chromogen als rote Färbung sichtbar gemacht werden.

Im Anschluss wurden die Schnitte dreimalig mit destilliertem Wasser gespült, mit Meyers Hämalaun gegengefärbt und abschließend mit Kaisers Glycergelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

Die Verdünnung der primären Antikörper betrug 1:200 in Dako antibody diluent. Nur bei ALP wurde die Verdünnung auf 1:500 optimiert.

Bei den primären Antikörpern ALP und OC handelte es sich um monoklonale Mausantikörper, bei COL I und BSP um polyklonale Kaninchenantikörper, welche von Dr. Larry Fisher, National Institutes of Health / National Institute of Dental Craniofacial Research zur Verfügung gestellt wurden (siehe Tabelle I). Deshalb wurden primäre Maus- und Kaninchenkörper (PP54 und PP64, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) als Negativkontrollen eingesetzt, um die Blockierung zu überprüfen und falsch positive Ergebnisse aufgrund von unspezifischen Bindungen der primären und sekundären Antikörper auszugrenzen.

Tabelle II: Verwendete primäre Antikörper

Antigen	Hersteller / Katalognummer	Isotyp / Wirt	Klonnummer / Klonalität
COL I	National Institutes of Health LF-39	Kaninchen	polyklonal
ALP	Sigma A2951	IgG2a Maus	8B6 monoklonal
OC	Abcam ab13420	IgG3 Maus	OCG3 monoklonal
BSP	National Institutes of Health LF-84	Kaninchen	polyklonal

Bei dem sekundäre Antikörper (DakoCytomation Envision + Dual link System Peroxidase, Dako, Glostrup, Dänemark) handelte es sich um ein mit Peroxidase markiertes Dextran, das mit Schafsantikörpern Anti-Maus und Anti-Kaninchen konjugiert wurde (siehe Tabelle II).

Tabelle III: Verwendeter sekundärer Antikörper

Antigen	Hersteller / Katalognummer	Wirt	Konjugation
Maus & Kaninchen	Dako K4063	Schaf	Peroxidase

2.3.3 Histomorphometrie

Von jedem Patienten wurde ein Schnitt aus der Immunhistologie halbautomatisch vermessen. Es wurden zunächst mit einer digitalen Kamera (Color View Illu[®], Olympus, Hamburg, Deutschland), die an ein Lichtmikroskop (Vanox-T AH-2, Olympus, Hamburg, Deutschland) angeschlossen war, Übersichtsaufnahmen der Schnitte angefertigt. Für die Auswertung wurde das Programm Analysis docu[®] (Olympus, Hamburg, Deutschland) genutzt. Die Größe des zu vermessenen Areals hatte immer eine Fläche von ca. 6 mm². Der Abstand vom Crestum zum Mittelpunkt des vermessenen Areals betrug ca. 3 mm.

Die Kantenlängen des vermessenen Areals betrugen ca. 2,3 mm x 2,6 mm. Es wurden jeweils der Anteil von Knochen, Weichgewebe (inklusive Knochenmark) und des verbliebenen Knochenersatzmaterials in mm² vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte als prozentuale Angabe der Gesamtfläche.



Abbildung 4: Histologische Übersichtsaufnahme einer Biopsie mit eingezeichnetem Vermessungsareal Immunhistochemischer Nachweis von Bone Sialoprotein (BSP). Entplasteter unentkalkter Sägeschnitt. Gegenfärbung. Meyer's Hämalaun. Meßbalken = 500 µm. Das rote Rechteck markiert das zu vermessene Areal.

2.3.4 Immunhistologie

Unter dem Lichtmikroskop wurden die immunhistochemisch gefärbten Schnitte nach einer Skala nach Knabe (2008) semiquantitativ ausgewertet (Knabe, 2005, Knabe, 2006). Es erfolgte die Beurteilung der immunhistologisch gefärbten zellulären Komponenten und die der gefärbten Matrixbestandteile. Sowohl die zellulären Komponenten (die Osteoblasten, die Osteozyten und Mesenchymzellen), als auch die Matrixbestandteile des Knochens (die fibröse Matrix und das Osteoid), wurden auf eine positive Färbung hin untersucht. Die Lokalisation und Morphologie der Zellen und Gewebekomponenten war ausschlaggebend für die Zuordnung der einzelnen Bestandteile. Die Auswertung aller Komponenten basierte auf einer Skala, die die Intensität der Färbung und die Verteilung der angefärbten Marker berücksichtigt. Wenn eine immunhistologische Reaktion stattgefunden hat, wurden die Färbungen in geringe Färbung (+), mittelmäßige Färbung (++) und starke Färbung (+++) eingeteilt. Ein weiterer zu berücksichtigender Faktor war die Lokalisation der Färbung. Diese konnte in eine lokalisierte oder generalisierte Färbung eingeteilt werden. Die Positivzeichen für die generalisierte Färbung wurden dabei zusätzlich markiert. Zum besseren Verständnis siehe Tabelle III.

Es wurde für jeden osteogenen Marker je ein Zahlenwert für jede Gewebskomponente für jeden Patienten erhoben. Beurteilt wurden dabei so die zellulären Komponenten bestehend aus Osteozyten, Osteoblasten und Mesenchymzellen sowie die Matrixkomponenten, zu der knöcherne, fibröse Matrix und das Osteoid gehören. Anschließend wurden die Werte der Einzelmessungen für die jeweils betrachtete Patientengruppe gemittelt. Dabei wurde der Wert 0 als nicht vorhandene Färbung, Mittelwerte von 0,1-0,9 als minimale, Mittelwerte von 1,0-2,2 als milde, Mittelwerte von 2,3-2,4 als moderate und Mittelwerte von 3,5-5 als starke Färbung eingestuft. Durch den Vergleich der Mittelwerte zwischen den jeweiligen Patienten-Gruppen konnten somit Aussagen über die Knochenbildungs- und Remodelingsaktivität in den Biopaten getroffen werden.

Tabelle IV: Ordinale Bewertungsskala

Lokalisation	Färbung	Bewertung	Wert
keine	keine	0	0
lokalisiert	leicht	+	1
	mittel	++	3
	stark	+++	4
generalisiert	leicht	⊕	2
	mittel	⊕⊕	4
	stark	⊕⊕⊕	5

Tabelle Knabe 2008

2.3.5 Statistische Methodik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Statistik-Software SAS (Version 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA). Für den Vergleich der bereits unter Punkt 2.1 aufgezählten Parameter wurden Mann-Whitney-U-Tests und F-Tests mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ durchgeführt. Bei einem p -Wert $\leq 0,05$ lag ein statistisch signifikantes Ergebnis vor, ein hochsignifikantes bei Werten von $p \leq 0,01$.

Für die graphische Darstellung der Parameter wurden Box-and-whisker-plots und darüber hinaus kamen Regressionsmodelle und die Spearmankorrelation zum Einsatz, die in dem Abschnitt Ergebnisse aufgeführt werden. Für die Darstellung der immunhistologischen Daten wurden Häufigkeitsdiagramme mit Hilfe der oben aufgeführten ordinalen Bewertungsskala erstellt und rein deskriptiv ausgewertet.

Bezüglich der verschiedenen Parameter wurden folgende Gegenüberstellungen statistisch erfasst:

- Darstellung der Knochenregeneration in Abhängigkeit vom Geschlecht,
- Darstellung der Knochenregeneration in Abhängigkeit vom Geschlecht und BMI,
- Darstellung der Knochenregeneration in Abhängigkeit vom Rauchverhalten,
- Darstellung der Knochenregeneration in Abhängigkeit vom freien Androgenindex und
- Darstellung der Knochenregeneration in Abhängigkeit vom Östradiolwert.

2.3.6 Ethische Erklärung

Im Rahmen der Operationsaufklärung wurden alle Patienten intensiv über den augmentativen Eingriff und die Implantatinserterion sowie die Gewinnung des Knochens bei re-entry routinemäßig mündlich und schriftlich informiert und gaben dafür schriftlich ihre Einverständniserklärung. Alle Patienten wurden ebenfalls über den Ablauf der Nachuntersuchung sowie über die Verwendung der Erkenntnisse im Rahmen der Studie intensiv aufgeklärt. Sie gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Durchführung der Nachuntersuchung und zur Teilnahme an der Studie. Sämtliche daraus gewonnenen Daten wurden anonymisiert. Alle chirurgischen Schritte wurden von nur einem Chirurgen durchgeführt, es wurden keinerlei zusätzliche, Patienten belastende Untersuchungsmethoden angewendet. Der Vorgang der Studie folgt streng den ethischen Prinzipien der Deklaration von Helsinki (World Medical Association, 2013). Eine zu Studienzwecken nötige Anwendung von Röntgenstrahlen wurde aus

strahlenhygienischen und ethischen Gründen streng vermieden bzw. abgelehnt. Die Studie wurde genehmigt von der Freiburger Ethik-Kommission-International (feki Code: 013/1294).

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Ergebnisse

Die Sinusbodenaugmentation verlief bei allen 120 Patienten komplikationslos. Es traten weder Entzündungen oder Abstoßungsreaktionen noch Perforationen der Schneide`rschen Membran auf. Nach einer Einheildauer von 6 Monaten erfolgte im Rahmen der Implantatinserterion die Entnahme des Knochenbiopates. Dabei wurde mittels Trepanfräse ein Knochenzylinder von 7-10 mm, in Abhängigkeit der gewählten Implantatlänge, entnommen und das Implantat nach finaler Aufbereitung der Knochenkavität in den aufgebauten Kiefer gesetzt.

In der Gruppe der 60 Männer gab es 16 mit einem pathologischen Testosteronwert (wovon 4 zu hoch und 12 zu niedrig waren), 15 mit pathologischen SHBG-Werten (14 zu hoch und 1 zu niedrig), 29 mit pathologischen freien Testosteronwerten (2 zu hoch und 27 zu niedrig), 3 mit pathologischem freien Androgenindex (zu niedrig) und 4 Männer mit einem pathologischen E₂-Wert (3 zu hoch und 1 zu niedrig). Dabei kam es in einzelnen Fällen vor, dass ein Patient pathologische Werte unterschiedlicher Hormone aufwies.

17 Männer waren Raucher und 36 hatten einen erhöhten BMI.

In der Gruppe der 60 Frauen hatten 9 pathologische Testosteronwerte (wovon einer zu hoch und 8 zu niedrig waren), 26 hatten pathologische SHBG-Werte (25 zu hoch und 1 zu niedrig), 17 zeigten pathologische E₂-Werte (6 zu hoch und 11 zu niedrig) und eine Frau hatte einen pathologischen freien Testosteronwert und gleichzeitig einen pathologischen freien Androgenindex, wobei beide Werte zu hoch waren. Auch hier kam es vor, dass verschiedene Hormonwerte bei einigen Frauen pathologisch waren.

Von den Frauen waren während der Studie 51 in der Menopause.

11 der 60 Frauen waren Raucher und bei 24 war der BMI erhöht.

Von den 120 Patienten waren lediglich 2 Diabetiker.

Da der Großteil der Patienten einen geringfügigen Alkoholkonsum hatte, konnte der Einfluss von verstärktem Alkoholkonsum auf die Knochenbildung nicht beurteilt werden.

Die Parameter Diabetes, Alkoholkonsum, Vit D- und Mg Einnahmen auf die Knochenregeneration konnten nicht fundiert untersucht bzw. konnten keine schlüssigen statistischen Analysen durchgeführt werden, da die Patientengruppen auf die diese Parameter

Ergebnisse

zutrafen eine zu geringe Anzahl hatten. Um eine Unterteilung der Altersgruppe vorzunehmen lagen die Patientenalter bis auf nur sehr wenige Ausnahmen zu eng beieinander, um eine statistisch relevante Analyse durchzuführen.

Tabelle V: Übersicht der medizinischen Anamnese und der den Lebensstil beschreibenden Parameter von allen 120 Patienten.

	Frauen		Männer	
	N	%	N	%
Anzahl N	60		60	
Ovarektomie	6	10.00%	---	---
Menopause	51	85.00%	---	---
Hormonsubstitution	16	26.67%	5	8.33%
Anzahl der Kinder				
0	27	45.00%	---	---
1	13	21.67%	---	---
2	18	30.00%	---	---
3	2	3.33%	---	---
Raucher	12	20.00%	17	28.33%
Alkoholkonsum				
*	22	36.67%	16	26.67%
**	2	3.33%	7	11.67%
***	0	0.00%	2	3.33%
Sportliche Aktivität				
*	6	10.00%	7	11.67%
**	2	3.33%	5	8.33%
***	15	25.00%	12	20.00%
****	1	1.67%	2	3.33%
	Frauen (N=60)		Männer (N=60)	
	Mittelwert	Standartabweichung	Mittelwert	Standartabweichung
Alter	62.72	10.81	60.24	10.89
Eintritt in die Menopause	51.68	6.49	---	---
BMI	23.87	3.88	25.78	3.09

3.2 Histologische Ergebnisse

Die Biopsien wurden für die histologische Auswertung aufbereitet, immunhistologisch gefärbt und im Anschluss histomorphometrisch und immunhistochemisch ausgewertet. Dabei zeigte sich in allen Biopsien eine knöcherne Integration der Ceros[®]-Partikel.

In allen Biopsien hat eine teilweise knöcherne Umwandlung von Ceros[®]-Partikeln in neuen Knochen stattgefunden. Es lagen keine großen undurchwachsenen Partikelareale vor. Das klinische Bild einer Entzündungsfreiheit im augmentierten Bereich wurde auch in den Schnitten bestätigt. Der neu gebildete Knochen stellte sich mikroskopisch als Geflechtknochen sowie als reife Knochen trabekel und die Ceros[®]-Partikel mit einer kantigen Struktur dar (Abb. 4-9). Die degradierenden Knochenersatzmaterialpartikel wiesen am Knochen-Biomaterial Interface nach 6 Monaten einen hohen Knochenpartikelkontakt auf und waren sogar in vielen Biopaten stellenweise von Knochen ganz umgeben (Abb. 8, 9). In anderen Bereichen zeigten die Ceros[®]-Partikel an einem Teil ihrer Oberfläche Kontakt zu Markräumen (Abb. 6-8). Es war ein Voranschreiten der Knochenbildung von crestal nach apikal sichtbar. Somit lagen weiter apikal auch Ceros[®]-Tricalciumphosphatpartikel vor, die z. T. von noch nicht mineralisiertem oder gerade mineralisiertem osteogenen Mesenchym umgeben waren (Abb. 7). In den Detailaufnahmen der Biopsien war ferner in den sich auflösenden Partikel vielerorts eine aktive Knochenbildung durch in das Ersatzmaterial eingewanderte Osteoblasten sichtbar (Abb. 6,8,9).

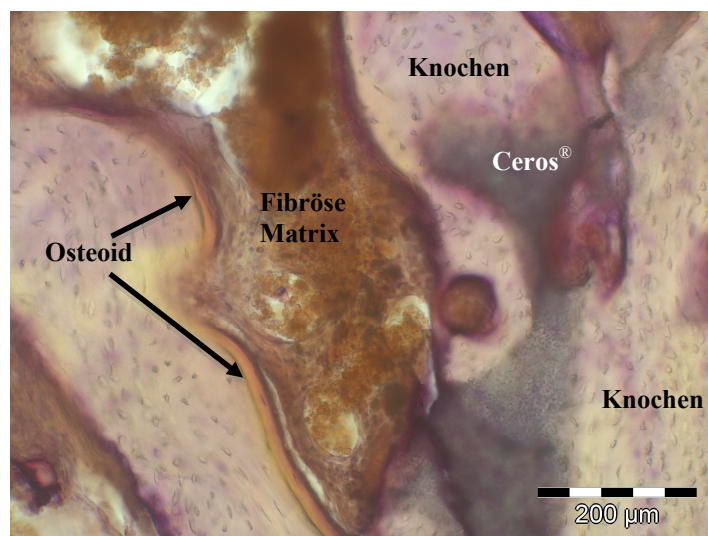


Abbildung 5: Histologische Detailaufnahme eines im Knochen eingebetteten Cerospartikels. Immunhistochemischer Nachweis von Bone Sialoprotein (BSP). Der Ceros[®]-Partikel ist fast vollständig knöchern ummantelt. Eine gut ausgebildete Osteoidschicht mit starker BSP-Expression ist sichtbar. Fibröse Matrix = Markraum. Entplasteter unentkalkter Sägeschnitt. Gegenfärbung. Meyer's Hämalan. Maßbalken = 200 µm.

Eine deutliche Knochenmatrixbildung durch Wanderung von Osteoblasten in die Ceros[®]-Partikel war in vielen Schnitten deutlich sichtbar.

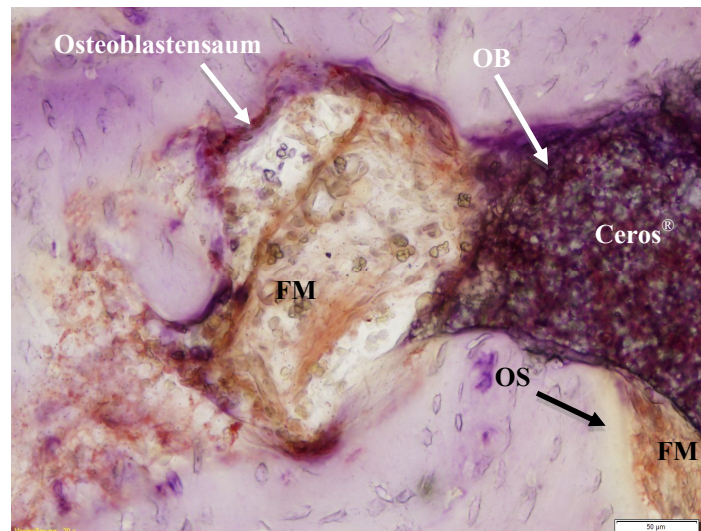


Abbildung 6: Histologische Detailaufnahme mit Partikeldegradation Immunhistochemischer Nachweis von Bone Sialoprotein (BSP). Entplasteter unentkalkter Sägeschnitt. Gegenfärbung. Meyer's Hämalan. Meßbalken = 50 µm. In den degradierenden Ceros®-Partikel eingewanderte Osteoblasten (OB) mit starker BSP Expression sind sichtbar. Die fibröse Matrix (FM) weist ebenso wie die knöcherne Matrix eine starke BSP-Expression auf. Weiterhin sind Osteoidsäume (OS) sichtbar.

Die Bildung des Osteoids war in vielen Detailaufnahmen sichtbar. Dies war teilweise auch in direktem Kontakt zu den Ceros®-Partikeln sichtbar.

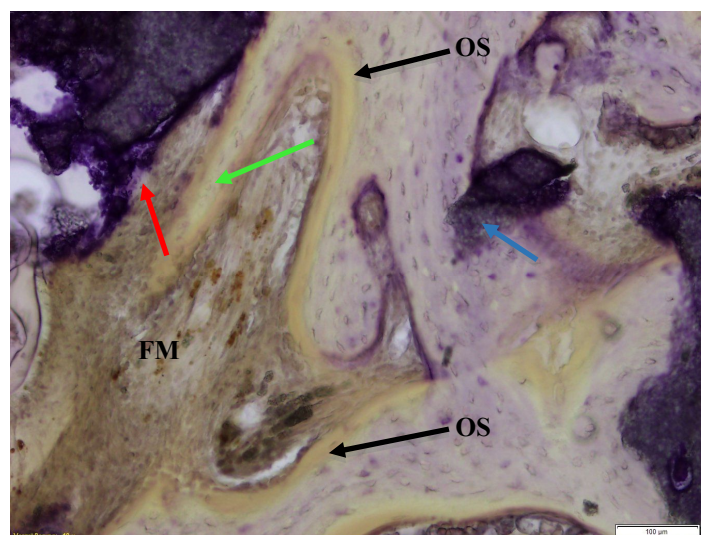


Abbildung 7: Histologische Detailaufnahme mit Osteoiddarstellung Immunhistochemischer Nachweis von Osteocalcin (OC). Entplasteter unentkalkter Sägeschnitt. Gegenfärbung. Meyer's Hämalan. Meßbalken = 100 µm. Sichtbar ist das Osteoid mit leichter Färbung bzw. Osteocalcinexpression. Der blaue Pfeil zeigt einen engen Knochen-Implantat-Kontakt mit bereits sichtbarer Partikeldegradation. Der rote Pfeil zeigt auf einen Bereich, in dem das noch nicht mineralisierte osteogene Mesenchym (= fibröse Matrix - FM), welches eine moderate Osteocalcinexpression aufweist, an den Ceros®-Partikel grenzt. Grüner Pfeil – gerade

entstehender Geflechtknochen. Zusammengefasst weist dies darauf hin, dass 6 Monate nach Sinusbodenaugmentation mit dem Ceros[®] Knochenersatzmaterial auf Tricalciumphosphatbasis die Knochenbildung und Partikeldegradation noch aktiv voranschreitet

Auch in der folgenden Detailaufnahme ist eine gute Partikeldegradation sichtbar. Vielerorts konnte auch hier ein enger Knochen-Implantat-Kontakt gesehen werden.

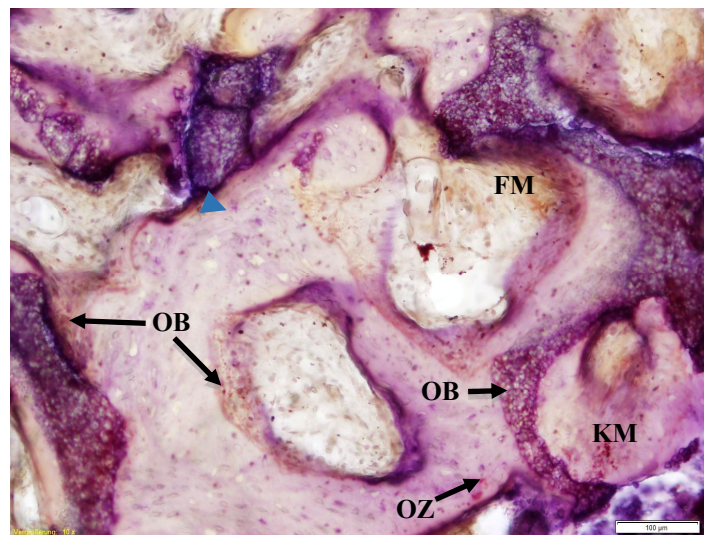


Abbildung 8: Histologische Detailaufnahme mit Knochen-Ceros[®]-Interface
Immunhistochemischer Nachweis von Collagen1 (COL I). Entplasteter unentkalkter Sägeschnitt. Gegenfärbung. Meyer's Hämalaun. Maßbalken = 100 µm. Neugebildete Knochentrabekel mit innigem Knochen-Implantat-Kontakt (blaue Pfeilspitze). Es ist eine starke Collagenexpression der Osteoblasten (OB) in den Poren der Ceros[®]-Partikel, in der knöchernen (KM) und der fibrösen Matrix (FM) sichtbar. Die Osteozyten weisen eine milde Färbung auf.

Die Darstellung verschiedener Zellstrukturen ist in der folgenden Detailaufnahme durch eine starke ALP Expression gut zu erkennen.

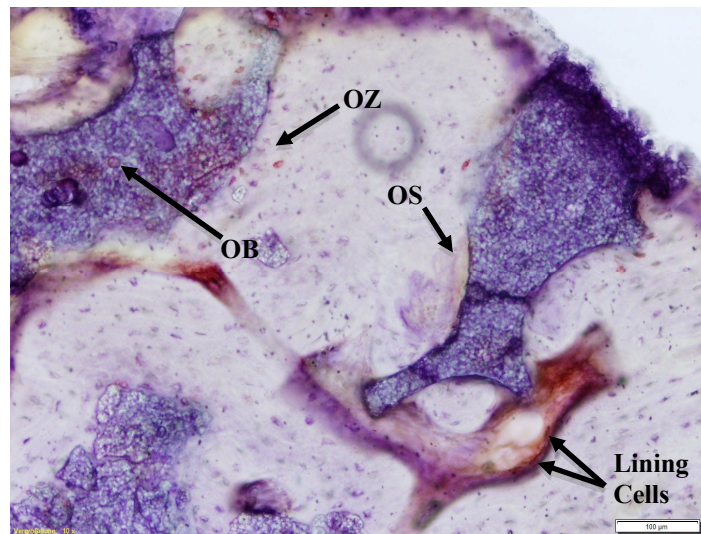


Abbildung 9: Histologische Detailaufnahme mit Lining Cells Immunhistochemischer Nachweis von Alkalischer Phosphatase (ALP). Entplasteter unentkalkter Sägeschnitt. Gegenfärbung. Meyer's Hämalaun. Maßbalken = 100 µm. Am Knochen-Implantat-Interface ist eine Osteoidschicht (OS) in milder Färbung sichtbar. Es liegen lokalisiert sowohl Osteoblasten (OB) als auch Osteozyten (OZ) mit starker ALP-Expression vor. Die Knochenoberfläche wird im markierten Bereich von Osteoid und Lining Cells mit starker ALP-Expression gesäumt.

3.2.1 Histomorphometrische Ergebnisse

3.2.1.1 Knochenbildung

Bei der Betrachtung der einzelnen Parameter auf die Knochenbildung wurde eine statistische Gegenüberstellung von Männern und Frauen, von übergewichtigen und nicht übergewichtigen Patienten sowie von Rauchern und Nichtrauchern durchgeführt. Eine weitere Gegenüberstellung wurde für beide Geschlechter getrennt in Bezug auf die entsprechenden BMI-, Östradiol- und freien Androgenindexwerten hin vorgenommen.

Die histomorphometrische Auswertung der ROI (Region of Interest), d. h. des vermessenen Areals von 6 mm² bestimmte den prozentualen Anteil des Knochens, der fibrösen Matrix und des restlichen verbliebenen Knochenersatzmaterials. Zur graphischen Darstellung wurden Box-and-whisker-plots gewählt. Die Box wird durch das 25 % bzw. 75 % Perzentil begrenzt. Der horizontale Strich in der Box kennzeichnet den Median, die Raute den Mittelwert. Die Länge der Box beschreibt den Interquartilabstand, der 50 % der Messwerte umschließt. Die Endpunkte der

Ergebnisse

Whisker kennzeichnen Minimum bzw. Maximum der Messwerte. Weiterhin kam zur statistischen Analyse u. a. der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz.

In dem folgenden Box-Plot wurden die Ergebnisse für den prozentualen Knochenanteil in Abhängigkeit vom Geschlecht der Probanden dargestellt. Werden die Werte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests analysiert, ergibt sich ein p-Wert von 0,21. Das bedeutet, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 79 % die Knochenregeneration vom Geschlecht der Probanden abhängt. Von einer signifikanten Abhängigkeit kann jedoch nicht gesprochen werden, da hierzu eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % bzw. eine 95 %ige Wahrscheinlichkeit der Abhängigkeit gegeben sein müsste. Der Mittelwert des Knochenanteils für die Männer betrug $26,52 \pm 12,82$ % (Abb. 10) mit einem Median von 27,14 %. Der Mittelwert des Knochenanteils für die Frauen lag bei $23,66 \pm 11,25$ % (Abb. 10) mit einem Median von 23,72 %.

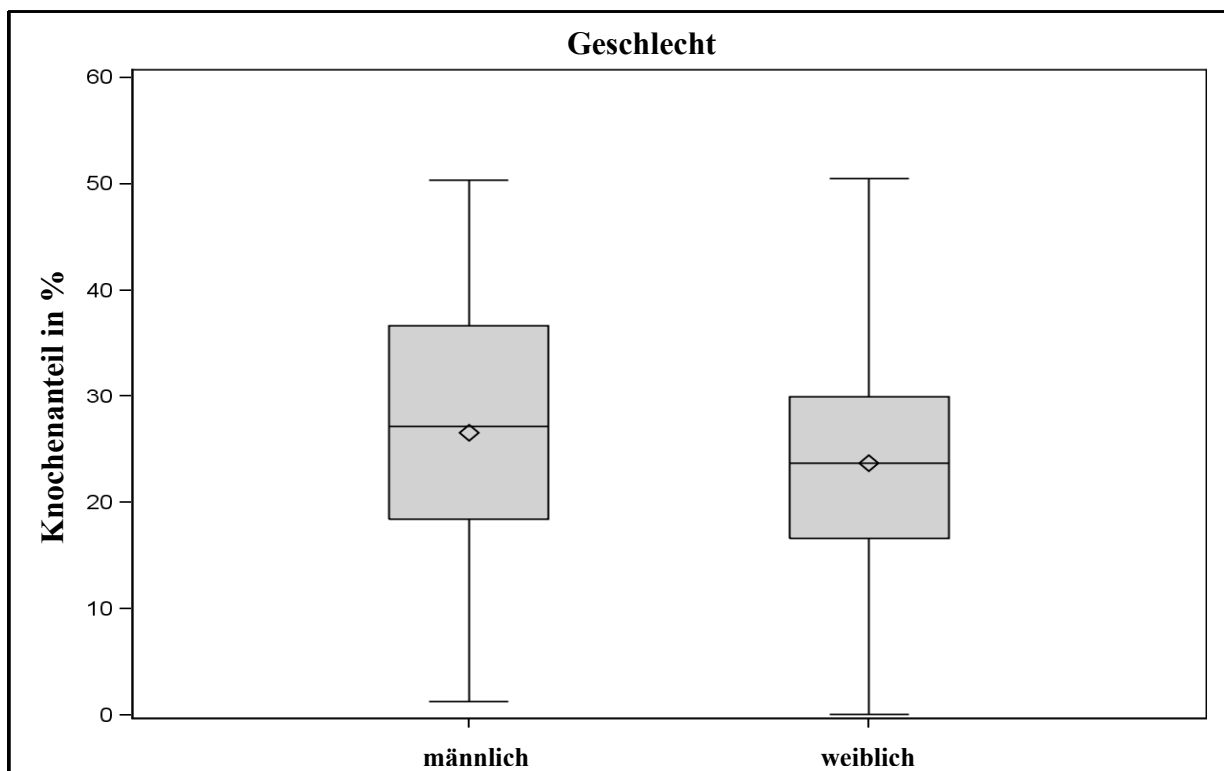


Abbildung 10: Box-plot-Diagramm für den Knochenanteil in Abhängigkeit des Geschlechts
Getrennte Darstellung des Knochenanteils der Biopate in % bei Männern und Frauen.

Als nächstes wurde die Gruppe der Patienten mit erhöhtem und nicht erhöhtem BMI betrachtet.

Die Analyse der Kombination der Parameter BMI und Knochenanteil ergab, dass die Patienten mit Übergewicht eine bessere Knochenregeneration aufwiesen als die Patienten ohne

Übergewicht. Der Mann-Whitney-U-Test ergab einen p-Wert von 0,10. Dies zeigt einen Einfluss des Body-Mass-Index der Probanden auf die Knochenregeneration, der jedoch nicht signifikant war. Der Mittelwert des Knochens der Patienten mit erhöhtem BMI betrug $26,87 \pm 11,57 \%$ (Abb. 11). Der Median lag bei 27,14 %. Der Mittelwert der Patienten ohne Übergewicht lag bei $23,30 \pm 12,44 \%$ (Abb. 11) und der Median bei 27,14 %.

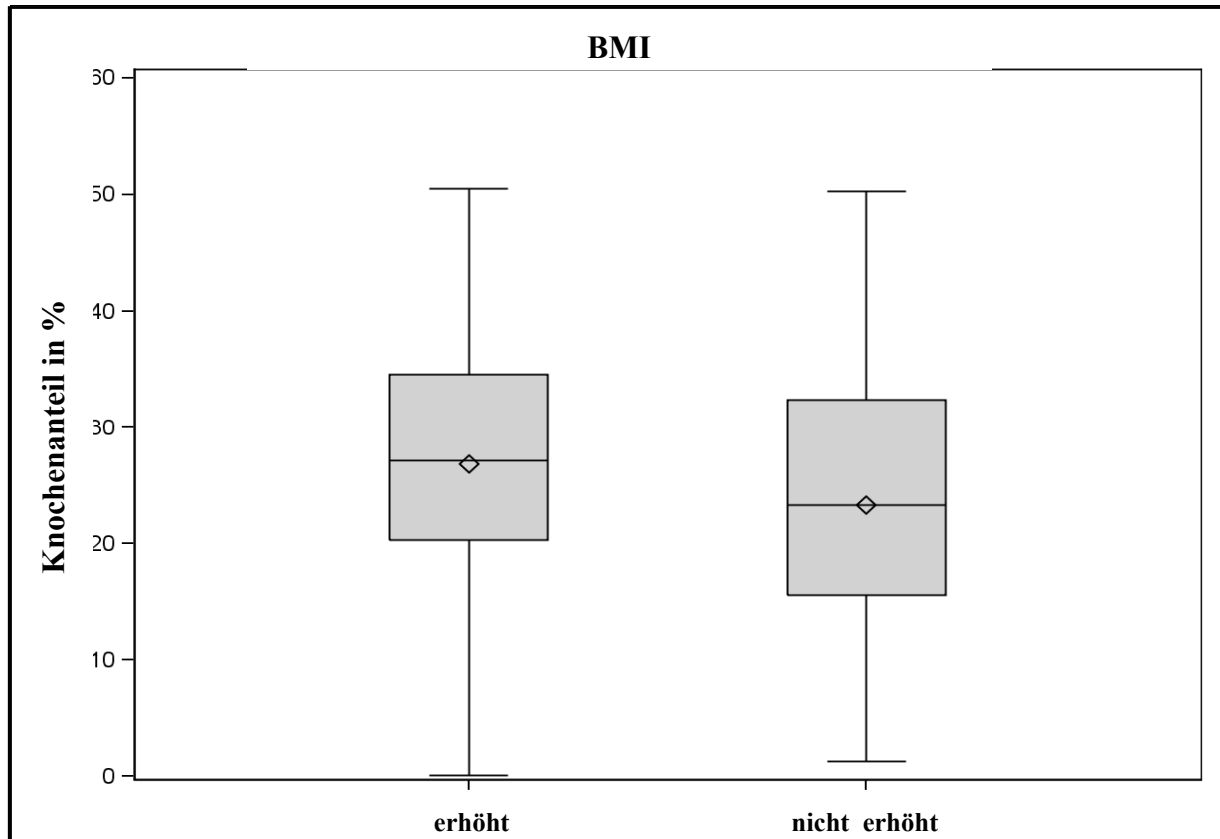


Abbildung 11: Box-plot-Diagramm für den Knochenanteil in Abhängigkeit vom BMI
Darstellung des Knochenanteils in % bei Patienten mit und ohne Übergewicht.

Im Folgenden wurden die Gruppen der Nichtraucher und Raucher gegenübergestellt.

Die Analyse des Einflusses des Rauchverhaltens auf die Knochenregeneration wies auf eine Tendenz zu geringeren Regenerationswerten für die Raucher hin. Der Mann-Whitney-U-Test ergab einen p-Wert von 0,09 woraus eine Tendenz in Bezug auf diesen Einfluss deutlich erkennbar hervorging, die aber nicht signifikant war. Der Mittelwert des Knochenanteils der Nichtraucher betrug $26,21 \pm 11,43 \%$ (Abb. 12) und der Median 24,95 %. Der Mittelwert der Raucher lag bei $21,39 \pm 13,68 \%$ (Abb. 12) mit einem Median bei 22,49 %.

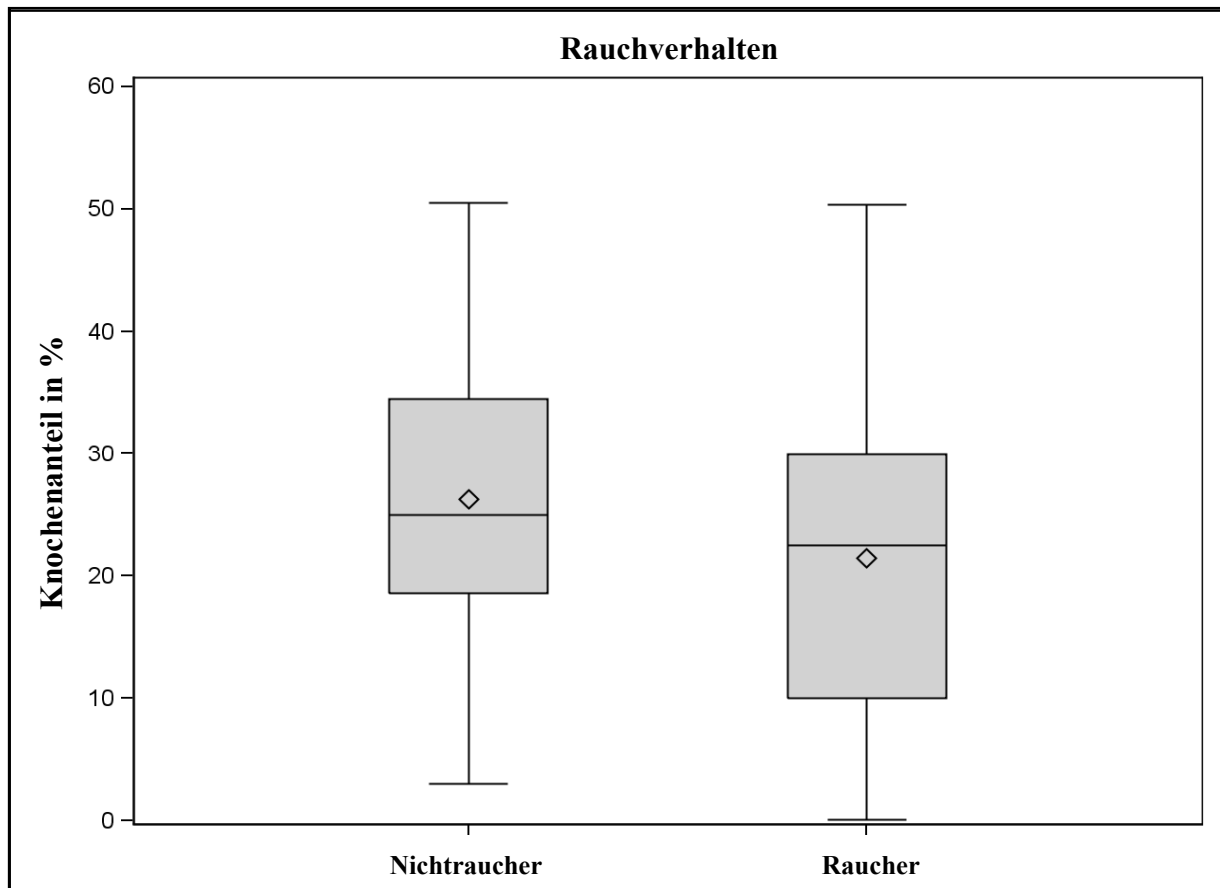


Abbildung 12: Box-plot-Diagramm für den Knochenanteil in Abhängigkeit vom Rauchverhalten Darstellung des Knochenanteils in % in den Gruppen der Nichtraucher und Raucher.

Bezüglich der Einflüsse der Sexualhormone Östrogen, Testosteron, freies Testosteron und SHBG auf die Menge des neugebildeten Knochens konnten in den ersten Analysen zunächst fast keine statistisch signifikanten Unterschiede bei zu oder abnehmenden Hormonkonzentrationen festgestellt werden. Nur die histomorphometrischen Analysen der Knochenmenge in Abhängigkeit der Höhe des freien Androgenindex (AI) zeigte für die Untergruppe der Frauen eine Signifikanz ($p = 0,0098$, F-Test) s. u. Hinsichtlich des Einflusses des Östrogens auf die Knochenbildung konnte eine Tendenz zur höheren Knochenbildung bei Patienten mit höheren Östradiolserumkonzentrationen in der Gesamtgruppe ($p = 0,10$; F-Test) und in Bezug auf das männliche Geschlecht ($p = 0,17$; F-Test) beobachtet werden. Bei der Betrachtung des BMIs wurde bei der Gegenüberstellung von Frauen und Männern nach dem tatsächlichen BMI-Wert eine signifikant höhere Knochenbildung bei steigendem BMI ($p = 0,02$; F-Test) in der Gesamtgruppe und in der Gruppe der Männer ($p = 0,03$; F-Test) festgestellt. Daher wurden lediglich diese drei Parameter in die weiterführenden detaillierteren statistischen Analysen mit

einbezogen. Hierfür wurden Regressionsmodelle mit Einteilung nach Geschlecht erstellt, Spearmankorrelationen erhoben und die p-Werte durch F-Tests bestimmt.

Wurde also bei der Untersuchung des Einflusses des Parameters freier Androgenindex auf die Knochenbildung unter Einsatz des F-Testes noch zusätzlich das Geschlecht der Probanden betrachtet, so zeigte sich ein deutlicher Einfluss des Androgenindexes in der Gruppe der Frauen. Dabei nahm die Knochenregeneration mit Zunahme des Androgenindexes ab. Hier ergab das Ergebnis des F-Testes mit $p = 0,0098$ einen hochsignifikanten Einfluss.

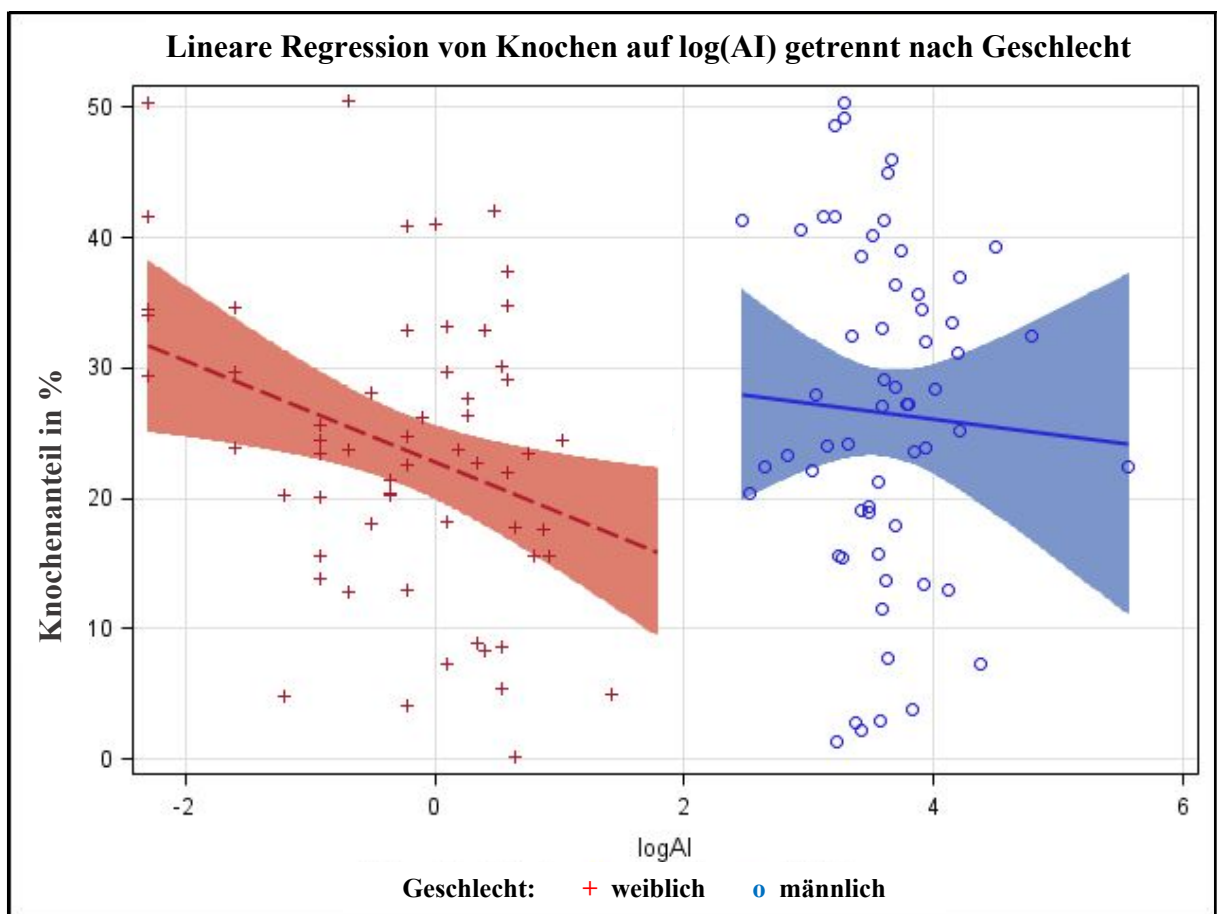


Abbildung 13: Punktwolke zur Darstellung des Knochenanteils in Abhängigkeit vom Wert des Androgenindexes und dem Geschlecht der Probanden Die blauen und roten Punktwolken beschreiben die Werteverteilung bei beiden Geschlechtern. Dabei stellen die roten Kreuze die Werte der Frauen und die blauen Kreise die Werte der Männer dar.

Die Analyse der Parameter Östradiol und Geschlecht und ihre Wirkung auf die Knochenregeneration ergab, dass die Männer mit steigenden Östradiolwerten eine höhere Knochenregeneration aufwiesen als die Frauen.

Der F-Test dieser Gegenüberstellung ergab in der Gruppe der Männer einen p-Wert von 0,17 und in der Gruppe der Frauen einen p-Wert von 0,36. Bei Betrachtung dieser Abbildung ist ein Unterschied in Bezug auf die Knochenregeneration zu Gunsten der Männer in Abhängigkeit von Östradiol erkennbar, der im F-Test nicht statistisch signifikant korreliert war. Die Spearmankorrelation zeigte jedoch eine signifikante Assoziation zwischen steigenden Östradiolserumkonzentrationen (LogE_2) und der Höhe der Knochenbildung bei Männern.

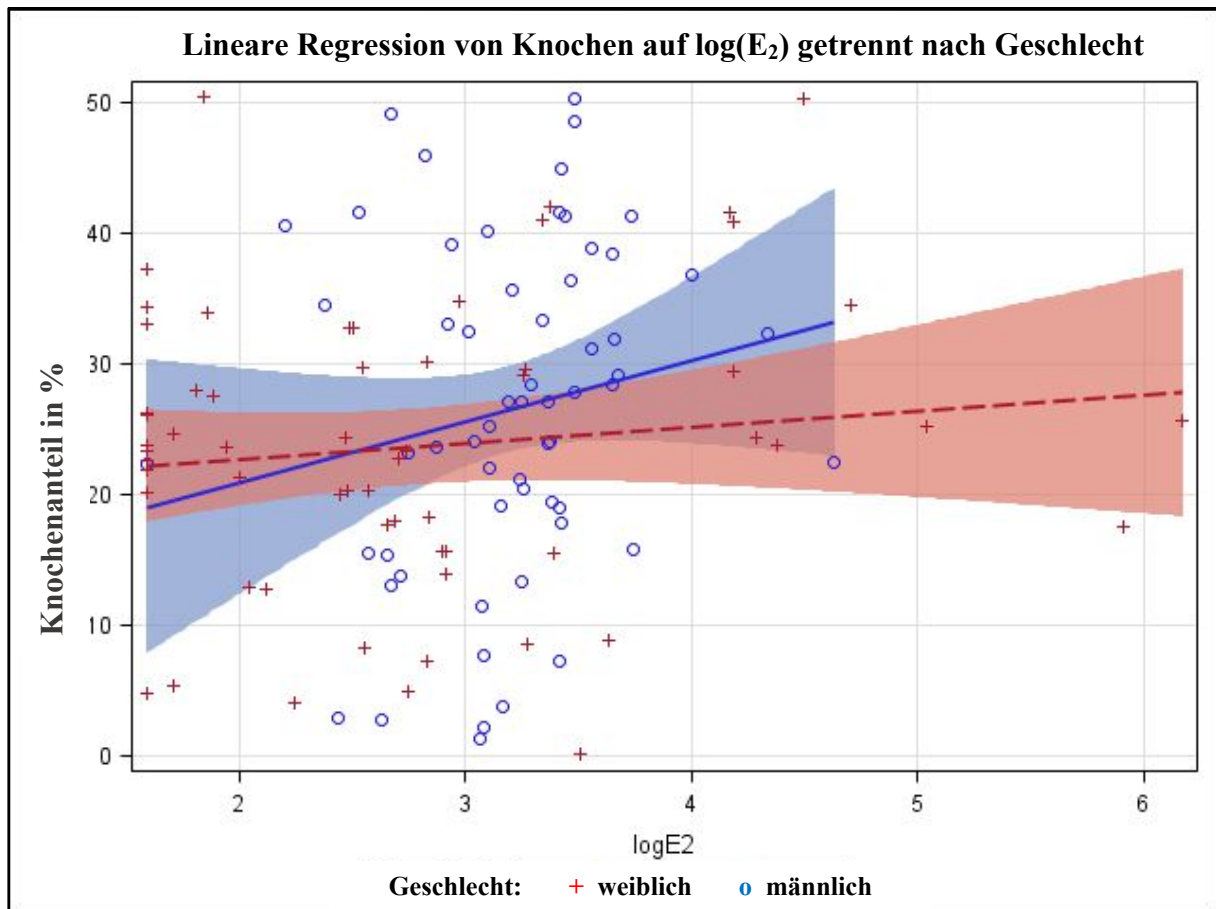


Abbildung 14: Punktwolke zur Darstellung des Knochenanteils in Abhängigkeit vom Östradiolwert und Geschlecht der Probanden Es wurden alle Kombinationen aus Östradiol, Geschlecht und Knochenregeneration als blaue Kreise (männlich) und rote Kreuze (weiblich) dargestellt. Die blaue und rote Ausgleichsgerade ist hier bestmöglich in die Punktwolken eingefügt worden.

Bei der Betrachtung der Knochenregeneration in der Gesamtgruppe aller Patienten in Abhängigkeit des BMIs ergab das Regressionsmodell bzw. der F-Test eine signifikant höhere Knochenbildung ($p = 0,02$) bei steigenden bzw. bis zu einem BMI von 35 erhöhten Werten. Vor

allem in der Untergruppe der Männer konnte dieser signifikante Einfluss mit einem p-Wert von 0,03 bestätigt werden.

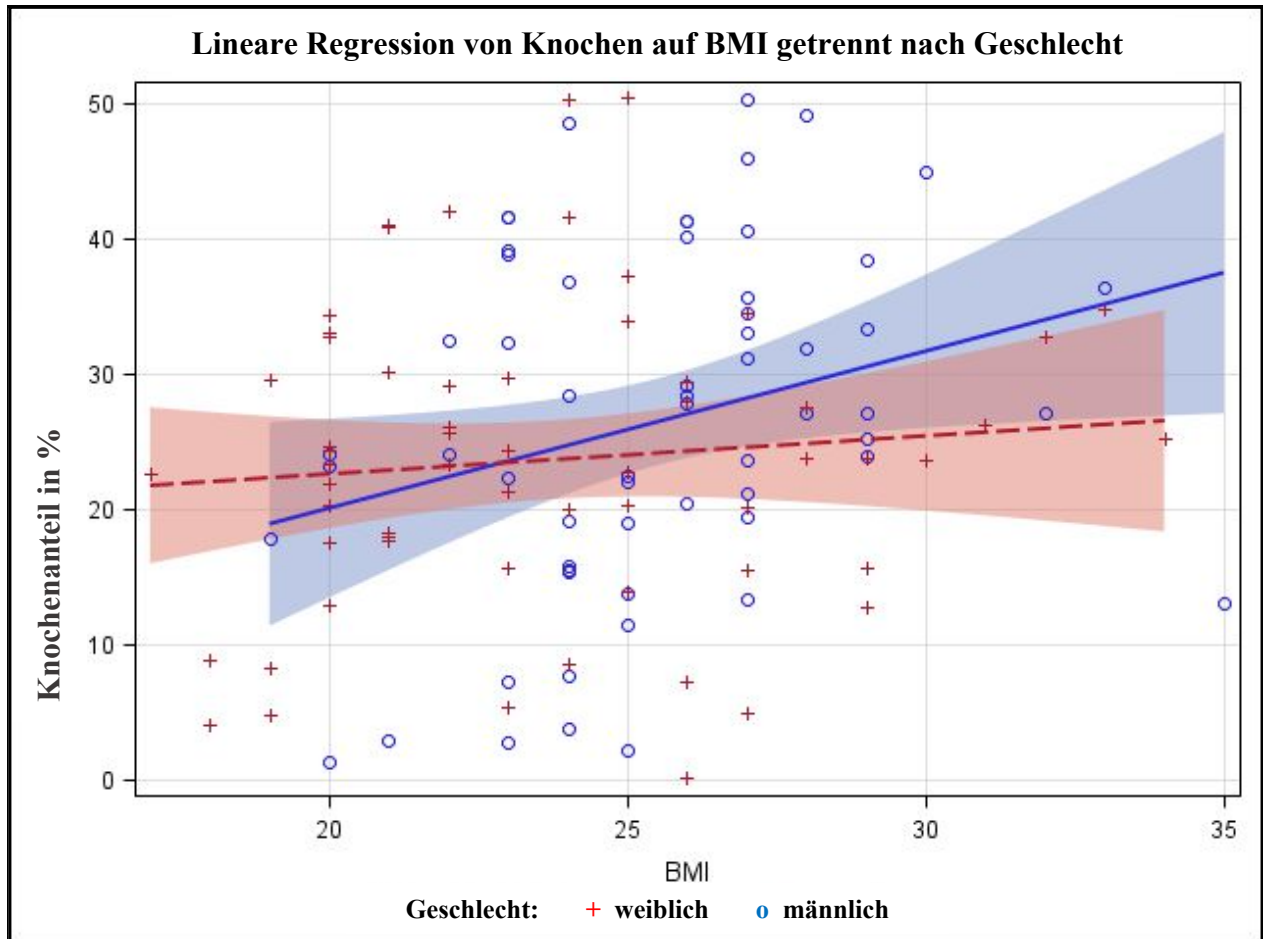


Abbildung 15: Punktwolke zur Darstellung des Knochenanteils in Abhängigkeit vom BMI und Geschlecht der Probanden Die blauen und roten Punktwolken beschreiben die Werteverteilung bei beiden Geschlechtern. Dabei stellen die roten Kreuze die Werte der Frauen und die blauen Kreise die Werte der Männer dar.

Die Betrachtungen aller weiteren Kombinationen von erhobenen Parametern zeigten keine Signifikanzen oder starken Tendenzen, so dass hier auf weitere Darstellungen verzichtet wurde.

3.2.1.2 Degradationsverhalten des Knochenersatzmaterials

Die Betrachtung des Einflusses des Geschlechts, BMI und Rauchverhaltens auf die Menge des verbliebenen Knochenersatzmaterials und damit auf dessen Resorbierbarkeit ergab geringere Mengen an verbliebenem Knochenersatzmaterial bei Männern im Vergleich zu Frauen ($p = 0,84$,

Mann-Whitney-U-Test), Patienten mit erhöhtem BMI im Vergleich zu nicht erhöhtem BMI ($p = 0,71$, Mann-Whitney-U-Test), und Nichtrauchern im Vergleich zu Rauchern ($p = 0,22$, Mann-Whitney-U-Test), diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

3.2.2 Immunhistologische Ergebnisse

Im Rahmen der immunhistologischen Auswertung wurde die Stärke der Expression von verschiedenen Markern der Osteogenese semiquantitativ ermittelt und ausgewertet. Dabei wurde bei jedem Schnitt die Intensität der Färbung des jeweiligen Markers in den einzelnen zellulären Bestandteilen und der jeweiligen Matrix separat beurteilt. Es folgte eine rein deskriptive Beurteilung der Werte, bei denen für die Bewertung der osteogenen Knochenphasen COL I als Marker der Proliferation, ALP als Marker der postproliferativen Phase für die Extrazelluläre-Matrix (ECM)-Reifung und OC und BSP als Marker der späten Phase für die Mineralisation verwendet wurde.

Die Negativ-Kontrollen der immunhistochemischen Färbungen mit gereinigten Antikörpern aus Kaninchen- bzw. Mausserum wiesen keine positiven Reaktionen auf, so dass falsch positive Ergebnisse durch unzureichendes Blockieren von unspezifischen und Kreuzreaktionen ausgeschlossen werden konnten.

Die Expressionen der vier Marker wurden in Bezug auf das Geschlecht, den BMI, das Rauchverhalten, das Östrogen und den freien Androgenindex hin ausgewertet.

3.2.2.1 Immunhistologische Auswertung der Patientengruppe der Männer

Die erste Gruppeneinteilung wurde nach Geschlecht vorgenommen. In der folgenden Tabelle wurden die Mittelwerte der Marker und ihre Expressionen in den einzelnen Gewebebestandteilen für die Gruppe der Männer aufgeführt.

Tabelle VI: Mittelwerte aller Marker und ihrer Expressionen in der Gruppe der Männer

	Osteo- blasten	Osteo- zyten	Mesenchym- zellen	fibröse Matrix	knöcherne Matrix	Osteoid
--	---------------------------	-------------------------	------------------------------	---------------------------	-----------------------------	----------------

Ergebnisse

COL I	1,40	1,40	1,13	2,45	1,48	1,70
ALP	0,98	1,08	0,93	1,73	1,17	0,95
OC	1,65	1,77	1,32	2,38	2,17	1,12
BSP	1,75	1,63	1,38	2,85	1,70	1,42

COL I als Marker der Knochenbildungsphase zeigte in der Gruppe der Männer eine milde Farbintensität in den Osteoblasten und Osteozyten (Mittelwert = 1,40) und mit einem Mittelwert von 1,13 auch eine milde Färbung der Mesenchymzellen. Auch die knöchernen Matrix (Mittelwert = 1,48) und das Osteoid (Mittelwert = 1,70) exprimierten COL I in milder Stärke. Die höchste Expression wies mit einer moderaten Färbung die fibröse Matrix mit einem Mittelwert von 2,45 auf.

ALP wurde als Knochenmarker der postproliferativen Phase am geringsten exprimiert. Dabei war vor allem in den Osteoblasten (Mittelwert = 0,98), in den Mesenchymzellen (Mittelwert = 0,93) und im Osteoid (Mittelwert = 0,95) nur eine minimale Färbung vorhanden. Eine milde Expression war in den Osteozyten (Mittelwert = 1,08), in der knöchernen Matrix (Mittelwert = 1,17) und in der fibrösen Matrix (Mittelwert = 1,73) zu sehen.

OC als Marker der Mineralisation wurde in zellulären Bestandteilen und in der knöchernen Matrix stärker exprimiert als COL I bzw. ALP. Die Mediane der Osteoblasten (Mittelwert = 1,65), Osteozyten (Mittelwert = 1,77), Mesenchymzellen (Mittelwert = 1,32) und knöchernen Matrix (Mittelwert = 2,17) waren zwar auch nur mild ausgeprägt, lagen aber in einem höheren Bereich als bei COL I und ALP. Die fibröse Matrix (Mittelwert = 2,38) war moderat und das Osteoid mit einem Mittelwert von 1,12 nur mild gefärbt.

BSP wurde als Marker der Mineralisation eingesetzt und zeigte bis auf die fibröse Matrix in allen restlichen zellulären Bestandteilen und in der knöchernen Matrix eine milde Färbung. Dabei lagen die Mittelwerte für die Osteoblasten (Mittelwert = 1,75) und die knöchernen Matrix (Mittelwert = 1,70) im Gegensatz zu den Osteozyten (Mittelwert = 1,63), den Mesenchymzellen (Mittelwert = 1,38) und dem Osteoid (Mittelwert = 1,42) in einem höheren Bereich der milden Werte. Nur die fibröse Matrix hatte eine moderate Expression mit einem Mittelwert von 2,85.

Zusammenfassend zeigte sich bei allen Markern eine stärkere Färbung der knöchernen Zellen als der Mesenchymzellen. Im Matrixgewebe wurden alle vier Marker in der fibrösen Matrix am stärksten exprimiert. Die Mittelwerte der Marker der späten Phase (OC und BSP) waren bis auf die Werte des Osteoids und der fibrösen Matrix in den Zell- und Gewebsstrukturen höher als die der frühen Phase (ALP und COL I).

Abbildung 16 zeigt, dass die geringen Färbeintensitäten bzw. eine negative Färbung in einem höheren Prozentanteil in allen vier Phasen vorkommen als die moderaten bis starken Färbeintensitäten. Dabei ist zu sehen, dass die Marker der späten Phase (OC und BSP) einen höheren Prozentsatz an starken Färbungen haben, als die Marker der frühen Phase (COL I und ALP).

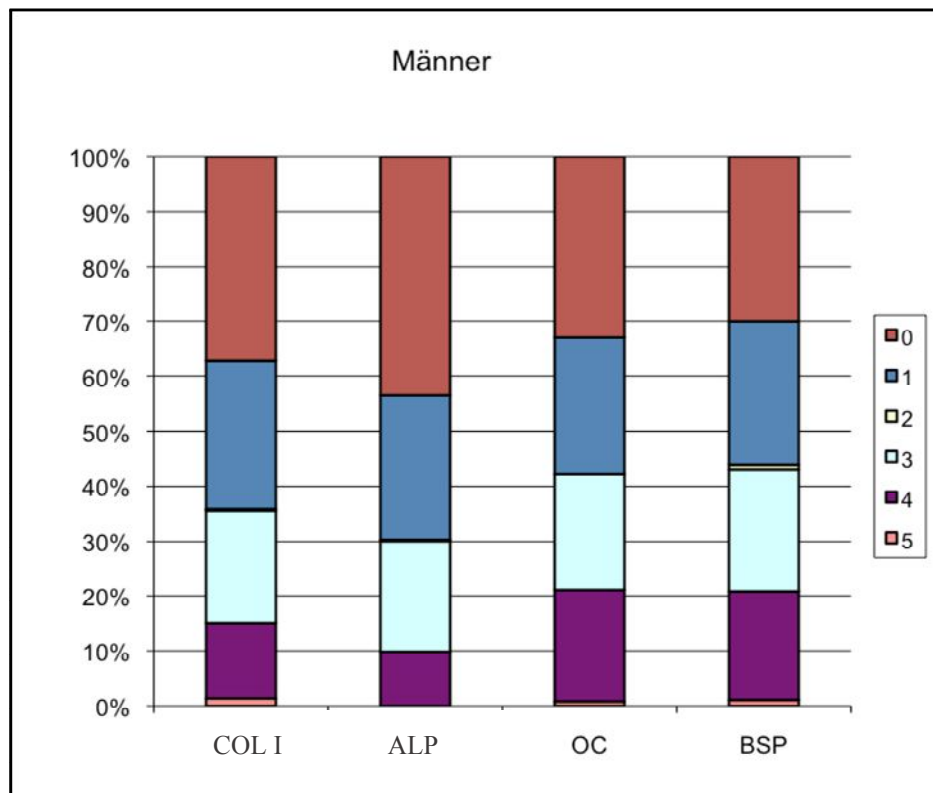


Abbildung 16: Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression in der Patientengruppe der Männer Es wurden alle Zell- und Matrixkomponenten nach ihren Färbeintensitäten zusammengefasst.

3.2.2.2 Immunhistologische Auswertung der Patientengruppe der Frauen

Als nächstes wurde die Gruppe der Frauen betrachtet. Eine Zusammenstellung aller Mittelwerte der Färbungen wurde in Tabelle VII dargestellt.

Tabelle VII: Mittelwerte aller Marker und ihrer Expressionen in der Gruppe der Frauen

	Osteo- blasten	Osteo- zyten	Mesenchym- zellen	fibröse Matrix	knöcherne Matrix	Osteoid
COL I	1,35	1,48	0,78	2,08	1,42	0,88
ALP	1,02	1,13	0,95	1,77	1,13	0,87
OC	1,20	1,47	0,98	2,00	1,87	0,98
BSP	1,62	1,78	1,43	2,073	1,85	1,37

COL I hatte in der Gruppe der Frauen eine minimale Ausprägung in den Mesenchymzellen (Mittelwert = 0,78) und im Osteoid (Mittelwert = 0,88). Die Osteoblasten (Mittelwert = 1,35) und Osteozyten (Mittelwert = 1,48) wurden genauso wie die fibröse Matrix (Mittelwert = 2,08) mild angefärbt. Im Vergleich zur Männergruppe waren hier lediglich die Mittelwerte der Osteoblasten und der fibrösen Matrix höher.

ALP wurde im Vergleich zur Gruppe der Männer in allen Strukturen geringer exprimiert. Eine minimale Ausprägung zeigte sich in den Mesenchymzellen (Mittelwert = 0,95) und im Osteoid (Mittelwert = 0,87). Die Osteoblasten (Mittelwert = 1,02), Osteozyten (Mittelwert = 1,13), fibröse (Mittelwert = 1,77) und die knöcherne Matrix (Mittelwert = 1,13) wurden lediglich mild angefärbt.

OC wies in allen zellulären Strukturen und in der fibrösen und knöchernen Matrix eine minimale bis milde Färbung auf. Dabei lagen die Mittelwerte der Mesenchymzellen bei 0,98, die der Osteoblasten bei 1,20 und die der Osteozyten bei 1,47. Auch die fibröse Matrix (Mittelwert = 2,00) und knöcherne Matrix (Mittelwert = 1,87) waren mild gefärbt. Nur das Osteoid (Mittelwert = 0,98) hatte eine minimale Ausprägung der Färbung.

BSP hatte in allen Komponenten eine stärkere Proteinexpression als die anderen Marker. Alle Zell- und Matrixkomponenten wurden mild angefärbt und wiesen die folgenden Mittelwerte auf:

Ergebnisse

Osteoblasten 1,62, Osteozyten 1,78, Mesenchymzellen 1,43, fibröse Matrix 2,73, knöcherne Matrix 1,85 und Osteoid 1,37.

Damit hatte BSP bis auf die fibröse Matrix im Vergleich zu den anderen Markern die stärkste Proteinexpression in allen restlichen Komponenten. Die knöchernen Zellstrukturen wiesen in der COL I Färbung eine höhere Farbintensität auf als in der OC Färbung. Wobei es sich in der knöchernen Matrix und im Osteoid gegenteilig verhält. Hier war im Gegensatz zu COL I eine stärkere OC Markerexpression sichtbar.

In Abbildung 17 zur Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpressionen ist zu sehen, dass die geringen Färbintensitäten bzw. eine nicht vorhandene Färbung in einem höheren Prozentanteil vor allem in der COL I und ALP Färbung vorkommen als die moderaten bis starken Färbintensitäten. Vor allem BSP als ein Marker der späten Phase, hat prozentual gesehen eine stärkere Färbintensität als die restlichen Marker.

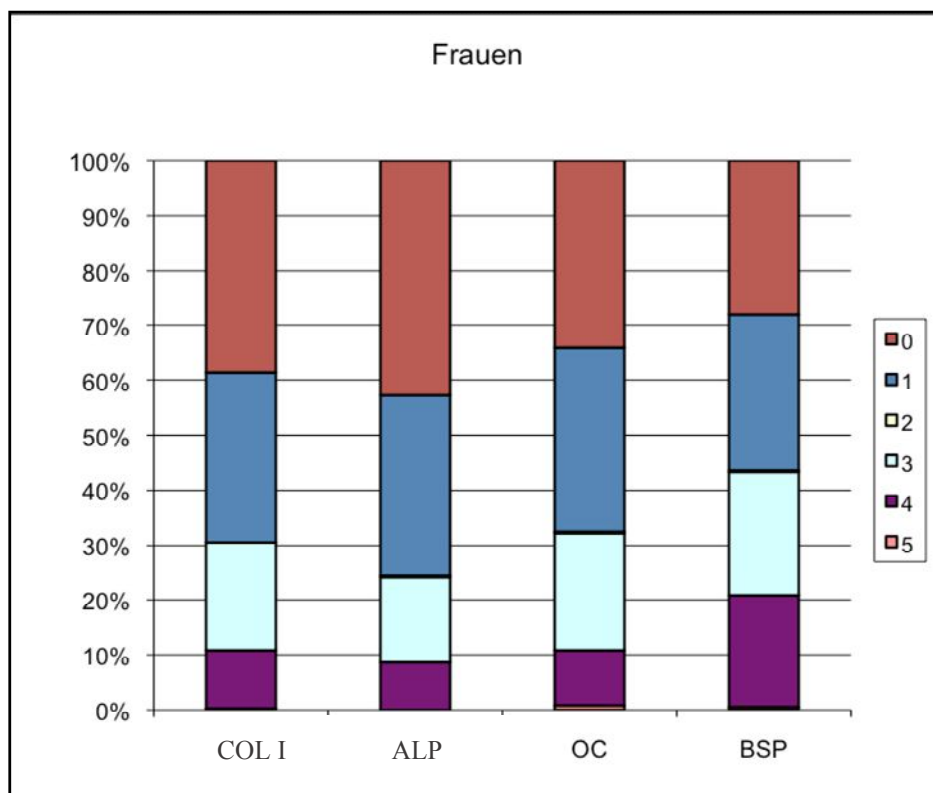


Abbildung 17: Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression in der Patientengruppe der Frauen Es wurden alle Zell- und Matrixkomponenten nach ihren Färbintensitäten zusammengefasst.

3.2.2.3 Immunhistologische Auswertung der Patientengruppe mit erhöhtem BMI

Als nächstes wurden die 60 Patienten mit erhöhtem BMI betrachtet. Eine Zusammenfassung aller Mittelwerte der Färbungen wurde in Tabelle VIII dargestellt.

Tabelle VIII: Mittelwerte aller Marker und ihrer Expressionen in der Gruppe der Patienten mit erhöhtem BMI

	Osteo- blasten	Osteo- zyten	Mesenchym- zellen	fibröse Matrix	knöcherne Matrix	Osteoid
COL I	1,58	1,55	1,03	2,47	1,67	1,28
ALP	1,02	1,18	0,90	1,80	1,20	0,98
OC	1,52	1,85	1,15	2,20	2,17	1,18
BSP	1,88	1,93	1,43	2,88	1,92	1,68

COL I hat in der Gruppe der Patienten mit einem erhöhtem BMI in der fibrösen Matrix eine moderate Färbung (Mittelwert = 2,47). Alle anderen Zell- und Matrixkomponenten waren nur mild angefärbt. Die Mittelwerte der Markerexpressionen der knöchernen Zellen und knöchernen Matrix lagen dicht beieinander. Dabei betrug der Mittelwert der Farbintensität der Osteoblasten 1,58 und der der Osteozyten 1,55. Die knöcherne Matrix hatte eine Farbintensität mit einem Mittelwert von 1,67. Der Mittelwert für das Osteoid lag bei 1,28 und der der Mesenchymzellen bei 1,03.

ALP hatte in allen Komponenten, bis auf die fibröse Matrix mit einer milden Färbung und einem Mittelwert von 1,8, nur geringe bis schwach milde Farbexpressionen. Der Mittelwert für die Osteoblasten lag bei 1,02 und der der Osteozyten bei 1,18. Die Mesenchymzellen hatten Markerexpressionen mit einem Mittelwert von 0,90 und das Osteoid von 0,98. Der Mittelwert für die knöcherne Matrix lag bei 1,20.

OC wurde als ein Marker der Mineralisation in allen Zellen, im Matrixgewebe und im Osteoid mild angefärbt. Die zellulären Strukturen, bestehend aus Osteoblasten (Mittelwert = 1,52),

Osteozyten (Mittelwert = 1,85) und Mesenchymzellen (Mittelwert = 1,15), wiesen eine milde Färbung auf. Die knöcherne (Mittelwert = 2,17) und die fibröse Matrix (Mittelwert = 2,20) zeigten eine Färbung im höheren Bereich der milden Markerexpression. Der Mittelwert für das Osteoid lag bei 1,18.

BSP als ein weiterer Marker der Mineralisation wurde mit dicht beieinander liegenden Mittelwerten für Osteoblasten 1,88, Osteozyten 1,93 und knöcherner Matrix 1,92 angefärbt. Diese Mittelwerte befinden sich im höheren Bereich der milden Färbung. Die Mesenchymzellen hatten eine Markerexpression mit dem Mittelwert von 1,43 und das Osteoid einen von 1,68. Diese entsprechen ebenfalls einer milden Färbung. Lediglich die Färbung der fibrösen Matrix (Mittelwert = 2,88) war moderat.

Bei der Gesamtbetrachtung der Markerexpressionen der Patienten mit erhöhtem BMI hatte wieder BSP die höchste Farbintensität. Nur in der knöchernen Matrix war OC als ein zweiter Marker der späten Phase noch stärker exprimiert. ALP als Marker der frühen Phase hatte die geringste Expression in allen Zell- und Gewebekomponenten.

In Abbildung 18 zur Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression ist zu sehen, dass die Färbeintensität von ALP zu einem höherem Prozentanteil in den stärkeren Farbintensitäten weniger häufig vorkommt als bei den restlichen Markern. Ferner ist an diesem Diagramm zu erkennen, dass die Menge an schwachen bis milden Färbungen generell höher ist als die der negativen Färbungen.

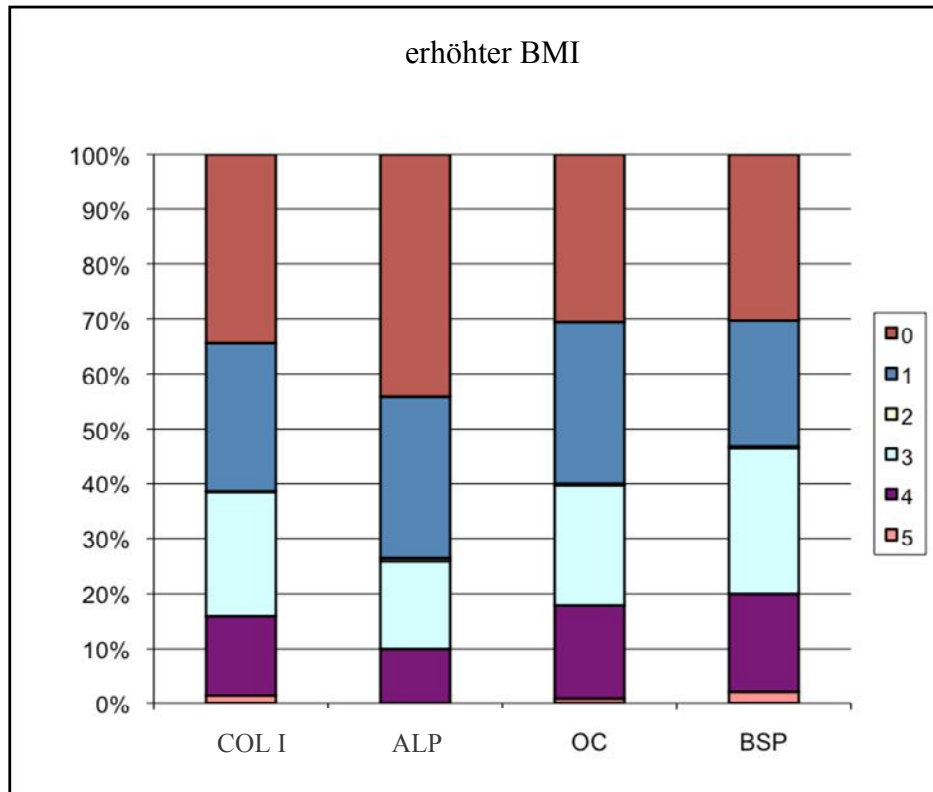


Abbildung 18: Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression in der Patientengruppe mit erhöhtem BMI Es wurden alle Zell- und Matrixkomponenten nach ihren Färbeintensitäten zusammengefasst.

3.2.2.4 Immunhistologische Auswertung der Patientengruppe mit nicht-erhöhtem BMI

Als nächstes wurden die 60 Patienten mit nicht-erhöhtem BMI betrachtet. Eine Zusammenfassung aller Mittelwerte der Färbungen wurde in Tabelle IX dargestellt.

Tabelle IX: Mittelwerte aller Marker und ihrer Expressionen in der Gruppe der Patienten mit nicht-erhöhtem BMI

	Osteo- blasten	Osteo- zyten	Mesenchym- zellen	fibröse Matrix	knöcherne Matrix	Osteoid
COL I	1,17	1,33	0,88	2,07	1,23	0,77
ALP	0,98	1,03	0,98	1,70	1,10	0,83

Ergebnisse

OC	1,33	1,38	1,15	2,18	1,87	0,92
BSP	1,48	1,48	1,38	2,70	1,63	1,10

COL I wurde in der Gruppe der Patienten ohne Übergewicht in den Mesenchymzellen (Mittelwert = 0,88) und dem Osteoid (Mittelwert = 0,77) nur minimal exprimiert. Die restlichen Bestandteile hatten eine milde Färbung. Der Mittelwert für die Osteoblasten lag bei 1,17 und für die Osteozyten bei 1,33. Der Mittelwert für die fibröse Matrix lag bei 2,07 und war ähnlich wie die knöcherne Matrix (Mittelwert = 1,23) mild gefärbt.

ALP wurde minimal bis mild exprimiert. Die Farbintensität der Osteoblasten und Mesenchymzellen, beide mit einem Mittelwert von 0,98, und das Osteoid (Mittelwert = 0,83) hatten eine minimale Färbung. Die Osteozyten (Mittelwert = 1,03), die fibröse Matrix (Mittelwert = 1,70) und die knöcherne Matrix (Mittelwert = 1,10) wurden mild gefärbt.

OC als ein Marker der Mineralisation wurde bis auf das Osteoid (Mittelwert = 0,92) in den restlichen Strukturen mild exprimiert. Die Expression der Osteoblasten mit einem Mittelwert von 1,33 war ähnlich stark wie die der Osteozyten (Mittelwert = 1,38). Die Mesenchymzellen mit einem Mittelwert der Markerexpression von 1,15, die fibröse Matrix mit 2,18 und die knöcherne Matrix mit 1,87 waren ebenfalls nur mild angefärbt.

BSP als ein weiterer Marker der Mineralisation hatte ähnliche Mittelwerte wie OC. Dabei hatten die Markerexpressionen der Osteoblasten und die der Osteozyten beide einen Mittelwert von 1,48 und waren somit mild gefärbt. Auch die restlichen Bestandteile, wie die Mesenchymzellen (Mittelwert = 1,38), das Osteoid (Mittelwert = 1,10), die fibröse (Mittelwert = 2,70) und die knöcherne Matrix (Mittelwert = 1,63), waren alle mild gefärbt.

Die Marker der späten Phase (OC und BSP) hatten im Vergleich zu COL I und ALP höhere Mittelwerte in allen Zell- und Gewebekomponenten. Am schwächsten wurde ALP als Marker der postproliferativen Phase in den knöchernen Zellstrukturen und in der fibrösen und knöchernen Matrix exprimiert.

Abbildung 19 zeigt die prozentuale Verteilung der Markerexpressionen. Es ist gut zu erkennen, dass die geringen Färbeintensitäten bzw. negativen Färbungen in einem höheren Prozentanteil bei allen vier Markern vorkommen als die moderaten bis starken Färbeintensitäten. Dabei ist zu

sehen, dass die Marker der späten Phase (OC und BSP) einen höheren Prozentsatz an starken Färbungen haben, als die Marker der frühen Phase (COL I und ALP).

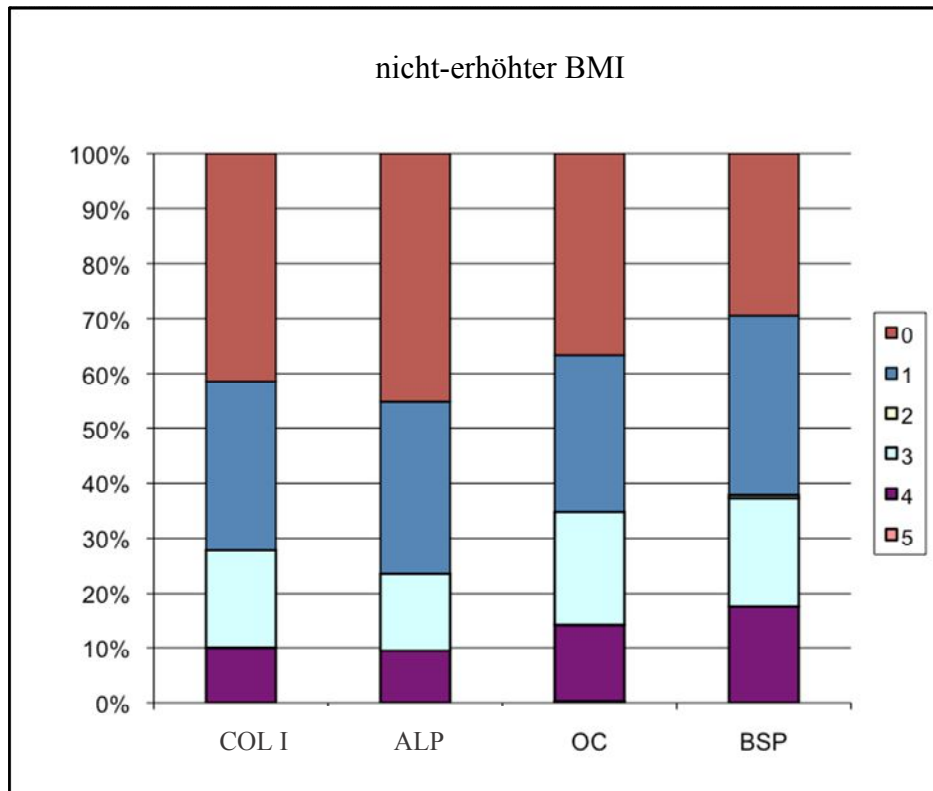


Abbildung 19: Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression in der Patientengruppe mit nicht-erhöhtem BMI. Es wurden alle Zell- und Matrixkomponenten nach ihren Färbeintensitäten zusammengefasst.

3.2.2.5 Immunhistologische Auswertung der Patientengruppe der Raucher

Als nächstes wurde die Gruppe der 28 Raucher betrachtet. Eine Zusammenfassung aller Mittelwerte der Färbungen wurde in Tabelle X dargestellt.

Tabelle X: Mittelwerte aller Marker und ihrer Expressionen in der Gruppe der Raucher

	Osteo- blasten	Osteo- zyten	Mesenchym- zellen	fibröse Matrix	knöcherne Matrix	Osteoid
COL I	0,96	1,14	0,79	2,10	1,18	1,00

Ergebnisse

ALP	0,79	0,89	0,93	1,68	0,86	0,68
OC	1,36	1,39	1,36	2,11	2,04	1,14
BSP	1,21	1,25	1,14	2,86	1,43	1,32

COL I wurde in der Gruppe der Raucher schwach bis mild exprimiert. Dabei wurden die Osteoblasten (Mittelwert = 0,96) und die Mesenchymzellen (Mittelwert = 0,79) nur schwach und die Osteozyten (Mittelwert = 1,14), die knöcherne Matrix (Mittelwert = 1,18), das Osteoid (Mittelwert = 1,00) und die fibröse Matrix (Mittelwert = 2,10) mild gefärbt.

ALP wurde bis auf die fibröse Matrix (Mittelwert = 1,68) nur schwach gefärbt. Für die Osteoblasten ergab sich ein Mittelwert von 0,79, für die Osteozyten einer von 0,89 und für die Mesenchymzellen lag der Mittelwert bei 0,93, die damit eine ähnliche Färbintensität zeigten. Die knöcherne Matrix hatte eine Farbintensität mit einem Mittelwert von 0,86. Das Osteoid wurde mit einem Mittelwert von 0,68 der Markerexpression am schwächsten gefärbt.

OC wurde in allen Bestandteilen mild gefärbt. Die Zellstrukturen, bestehend aus Osteozyten (Mittelwert = 1,39), Osteoblasten und Mesenchymzellen (beide mit einem Mittelwert von 1,36) exprimierten OC in ähnlicher Intensität. Die fibröse Matrix (Mittelwert = 2,11), die knöcherne Matrix (Mittelwert = 2,04) und das Osteoid (Mittelwert = 1,14) wurden ebenfalls mild gefärbt.

BSP wurde in der fibrösen Matrix als einzige Komponente mit einem Mittelwert von 2,86 moderat exprimiert. Die Osteoblasten (Mittelwert = 1,21), die Osteozyten (Mittelwert = 1,25), die Mesenchymzellen (Mittelwert = 1,14), die knöcherne Matrix (Mittelwert = 1,43) und das Osteoid (Mittelwert = 1,32) wurden hingegen mild gefärbt.

In der Gruppe der Raucher hatten die Marker der späten Phase (OC und BSP) höhere Mittelwerte als die Marker der frühen Phase (COL I und ALP).

Abbildung 20 zeigt die prozentuale Verteilung der Markerexpressionen. Dabei ist zu sehen, dass die Marker der späten Phase (OC und BSP) im Vergleich zu den Markern der frühen Phase (COL I und ALP) stärkere Färbintensitäten in einem höheren Prozentanteil aufweisen. Jedoch gibt es in allen Phasen vermehrt schwache und negative Färbungen.

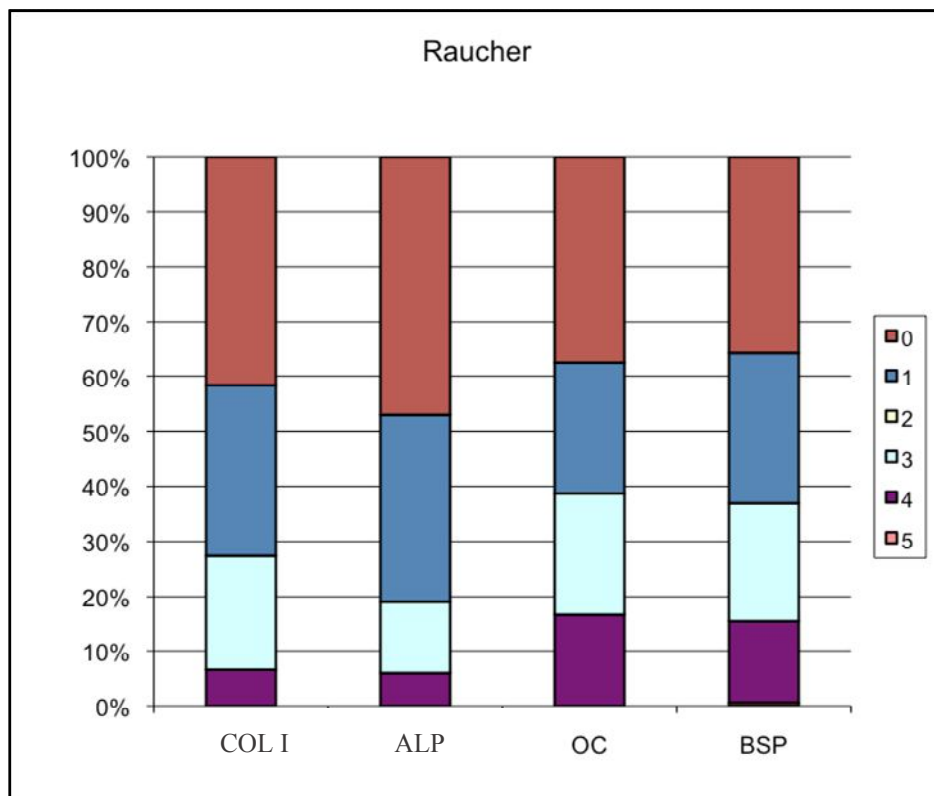


Abbildung 20: Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression in der Patientengruppe der Raucher Es wurden alle Zell- und Matrixkomponenten nach ihren Färbeintensitäten zusammengefasst.

3.2.2.6 Immunhistologische Auswertung der Patientengruppe der Nichtraucher

Als nächstes wurde die Gruppe der 92 Nichtraucher betrachtet. Eine Zusammenfassung aller Mittelwerte der Färbungen wurde in Tabelle XI dargestellt.

Tabelle XI: Mittelwerte aller Marker und ihrer Expressionen in der Gruppe der Nichtraucher

	Osteo- blasten	Osteo- zyten	Mesenchym- zellen	fibröse Matrix	knöcherne Matrix	Osteoid
COL I	1,50	1,53	1,01	2,32	1,53	1,03
ALP	1,07	1,17	0,95	1,77	1,24	0,98

Ergebnisse

OC	1,45	1,68	1,09	2,22	2,01	1,02
BSP	1,83	1,85	1,49	2,77	1,88	1,41

COL I wurde in der Gruppe der Nichtraucher mild bis moderat gefärbt. Die Osteoblasten (Mittelwert = 1,50), die Osteozyten und die knöcherne Matrix (beide mit einem Mittelwert von 1,53) zeigten eine milde Farbintensität. Die Mesenchymzellen exprimierten COL I ebenfalls mild (Mittelwert = 1,01). Die fibröse Matrix zeigte eine moderate Färbung und das Osteoid wurde mild gefärbt (Mittelwert = 1,03).

ALP wurde schwach bis mild exprimiert. Dabei wurden die Osteoblasten (Mittelwert = 1,07), die Osteozyten (Mittelwert = 1,17), die fibröse (Mittelwert = 1,77) und die knöcherne Matrix (Mittelwert = 1,52) mild gefärbt. Die Mesenchymzellen exprimierten ALP nur schwach. Auch das Osteoid (Mittelwert = 0,98) zeigte nur eine schwache Färbung.

OC wurde in der Gruppe der Nichtraucher durchgängig mild exprimiert. Die Mittelwerte für die Osteoblasten lagen mit 1,45 und die der Osteozyten mit 1,68 dicht beieinander. Die Mesenchymzellen (Mittelwert = 1,09) und das Osteoid (Mittelwert = 1,02) hatten ebenfalls eine milde Färbung. Die knöcherne Matrix hatte eine Farbintensität mit einem Mittelwert von 2,01 und die fibröse Matrix einen mit 2,22.

BSP wurde in den Osteoblasten (Mittelwert = 1,83), in den Osteozyten (Mittelwert = 1,85) und in der knöchernen Matrix (Mittelwert = 1,88) ähnlich mild exprimiert. Die Mesenchymzellen hatten einen Mittelwert von 1,49 und das Osteoid einen von 1,41. Eine moderate Färbung konnte in der fibrösen Matrix (Mittelwert = 2,77) nachgewiesen werden.

In der Gruppe der Nichtraucher war bis auf die knöcherne Matrix die höchste Expression wieder in der BSP Färbung und die schwächste Expression in der ALP Färbung zu sehen. Die Mittelwerte bei COL I waren bis auf die knöcherne Matrix denen der OC Färbung ähnlich hoch.

In Abbildung 21 wird die prozentuale Verteilung der Markerexpressionen dargestellt, die zeigt, dass die Marker COL I, OC und BSP in den stärkeren Färbintensitäten höhere Prozentwerte aufweisen als ALP. Ferner ist hier zu beobachten, dass die schwachen bis moderaten Färbungen prozentual häufiger vorkommen als die negativen Färbungen.

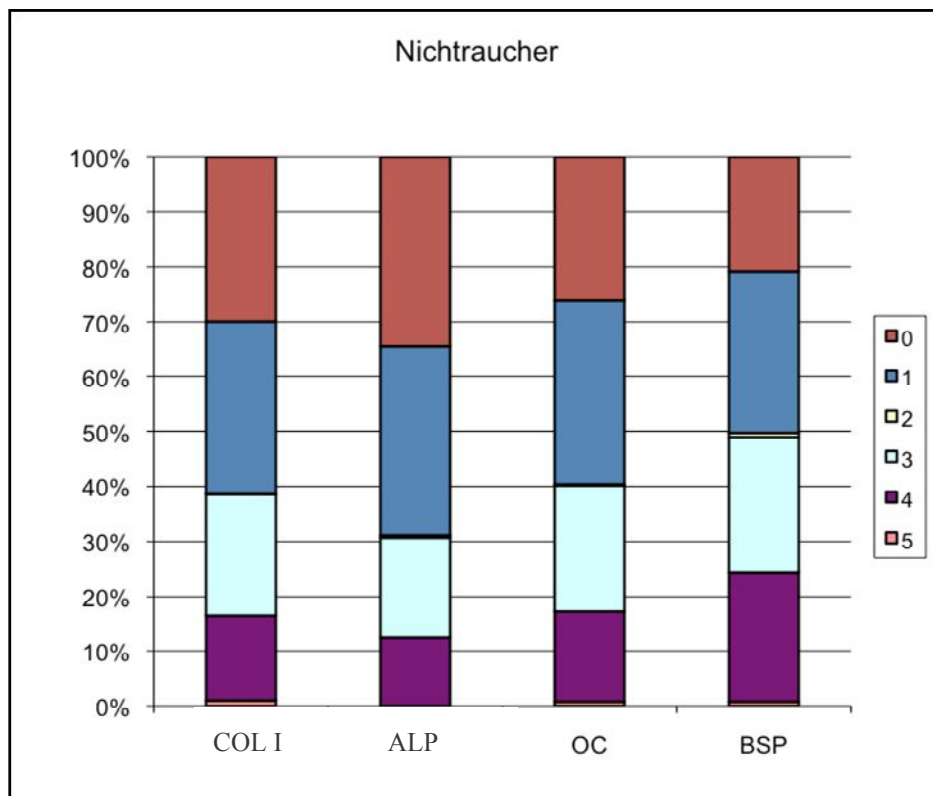


Abbildung 21: Darstellung der prozentualen Verteilung der Markerexpression in der Patientengruppe der Nichtraucher Es wurden alle Zell- und Matrixkomponenten nach ihren Färbeintensitäten zusammengefasst.

3.2.3 Zusammenfassung der histomorphometrischen und immunhistochemischen Ergebnisse

Die morphometrischen und immunhistochemischen Ergebnisse wurden in Bezug auf das Geschlecht, den BMI, das Rauchverhalten, den freien Androgenindex und den Östrogenwert analysiert.

Die in den statistischen Analysen berechneten p-Werte und Mittelwerte des prozentualen Knochenanteils zeigten zusammenfassend eine stärkere Knochenbildung bei den Männern in Vergleich zu Frauen. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Infolge des p-Wert von 0,21 kann dies als biologisch plausibles Ergebnis in Richtung einer Tendenz interpretiert werden, welches darüber hinaus durch die immunhistologischen Befunde untermauert wurde. Im Vergleich der Geschlechter lagen die Mittelwerte für die ALP Expression für Männer und Frauen nahe beieinander. Hinsichtlich der COL I Expression wiesen die Männer

höhere Mittelwerte auf. Besonders deutlich war hier der Unterschied bei der Anfärbung des Osteoids, wobei sich bei den Männern ein fast doppelt so hoher Expressionswert wie bei den Frauen ergab. Bei der BSP-Expression zeigte sich kein deutlicher Unterschied. Die OC-Expression war in allen untersuchten Gewebskomponenten in der Gruppe der Männer höher als bei den Frauen.

Bei der Betrachtung des Einflusses des Gewichts auf die Knochenregeneration konnten höhere Knochenbildungswerte bei den übergewichtigen Patienten festgestellt werden. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. Der p-Wert lag hier bei 0,10, was jedoch für eine ausgeprägte Tendenz zu Gunsten der Patienten mit Übergewicht spricht. Diese Tendenz wurde durch die immunhistochemischen Ergebnisse der osteogenen Markerexpressionen bekräftigt. Bei der Betrachtung der Patientengruppe mit Übergewicht wurden im Vergleich zu der Patientengruppe ohne Übergewicht für alle vier Marker in allen Gewebebestandteilen höhere Mittelwerte der Markerexpressionen bei den Übergewichtigen festgestellt mit Ausnahme der Mesenchymzellen in der ALP Färbung, bei denen die Markerexpression bei den übergewichtigen Patienten geringfügig niedriger war. Dies bedeutet, dass sowohl die Marker der frühen als auch der späten Phase der Osteoblastendifferenzierung stärkere Färbeintensitäten in der Gruppe der übergewichtigen Patienten zeigten.

Der Vergleich von Rauchern mit Nichtrauchern ergab eine höhere Knochenbildung bei Nichtrauchern mit einem p-Wert von 0,09, so dass keine statistische Signifikanz vorlag. Dennoch kann dies als starke Tendenz zu einer höheren Knochenregeneration zugunsten der Nichtraucher gewertet werden, was in Einklang mit den immunhistochemischen Ergebnissen ist. Im Vergleich der Gruppen Raucher und Nichtraucher lagen höhere Mittelwerte für die Expression aller osteogenen Marker bei den Nichtrauchern vor. Sowohl ALP und COL I als Marker der frühen Phase der Osteoblastendifferenzierung als auch OC und BSP als Marker der Spätphase der Osteoblastendifferenzierung und Knochenmatrixmineralisation wurden bei den Nichtrauchern in allen Zell- und Matrixkomponenten stärker exprimiert als bei den Rauchern.

Um weitere Zusammenhänge zu untersuchen, wurden im Rahmen einer stärker differenzierten Betrachtung zusätzliche Parameterkombinationen miteinander verglichen. Es konnten auch hier gleichgeartete Tendenzen bei den histomorphometrischen und immunhistologischen Ergebnissen festgestellt werden:

Wie bereits oben erwähnt, lagen bei den Männern sowohl hinsichtlich der Knochenbildung als auch bezüglich der osteogenen Markerexpression höhere Mittelwerte als bei den Frauen vor, was

sich ebenfalls in Kombination mit anderen Parametern bestätigte. Dabei konnten auch bei den übergewichtigen Männern höhere Mittelwerte für die Knochenbildung und die Expression der untersuchten osteogenen Marker in den verschiedenen Gewebskomponenten festgestellt werden als bei den übergewichtigen Frauen.

Im Vergleich der Nichtraucher zu den Rauchern wiesen die Nichtraucher höhere Mittelwerte für Knochenbildung und osteogene Markerexpression auf. Bei der Gegenüberstellung von zum einen männlichen und weiblichen Nichtrauchern und zum anderen männlichen und weiblichen Rauchern hatten die Nichtraucher bei beiden Geschlechtern, d. h. unabhängig vom Geschlecht, höhere Mittelwerte als die Raucher.

Die Betrachtung der Kombination weiterer Parameter (Geschlecht, BMI, Rauchverhalten) ergab, dass bei den übergewichtigen nichtrauchenden Männern sowohl höhere Mittelwerte für die Knochenbildung als auch für die osteogene Markerexpression beobachtet wurden als bei übergewichtigen nicht-rauchenden Frauen.

Der Vergleich der übergewichtigen rauchenden Männer mit übergewichtigen rauchenden Frauen zeigte höhere Werte in der Knochenregeneration bei den übergewichtigen, rauchenden Frauen.

Bei der Betrachtung des freien Androgenindexes getrennt nach dem Geschlecht wurde bei den Frauen mit steigendem FAI eine Abnahme der Knochenneubildung festgestellt (F-Test, $p = 0,0098$). Bei den Männern hatten weder höhere noch niedrigere FAI Werte eine Auswirkung auf die Knochenbildung.

Bezüglich der Östradiolwerte zeigten bei den Männern die Spearman Korrelation und lineare Regressionsanalyse eine signifikante positive Assoziation von Östradiolserumkonzentrationen (LogE_2) mit der Knochenbildung, während bei den Frauen höhere Östradiolwerte lediglich eine geringfügige Auswirkungen auf die Knochenbildung hatten, jedoch ohne jegliche statistische Signifikanz.

In der Gesamtgruppe aller untersuchten Patienten korrelierte ein höherer BMI mit verstärkter Knochenbildung (F-Test, $p = 0,02$). Dies traf auch für die Gruppe der Männer zu (F-Test, $p = 0,03$), jedoch nicht für die Gruppe der Frauen (F-Test, $p = 0,45$).

Zusammengenommen zeichnete sich somit eine Tendenz zur höheren Knochenbildung bzw. verstärkten osteogenen Markerexpression und damit Knochenreifung bei Männern, Patienten mit erhöhtem BMI und Nichtrauchern ab.

Der Einfluss diverser anamnestischer Parameter auf die Knochenbildung konnte aufgrund der zu kleinen Gruppen nicht fundiert analysiert werden.

Die Knochenbildung wurde von der sportlichen Aktivität der Patienten nicht beeinflusst.

Da das Alter der Patienten in der vorliegenden Studie zu eng zusammenlag und es nur eine geringe Anzahl von Patienten mit relativ hohen oder relativ geringen Alter gab, konnte in der vorliegenden Studie kein Einfluss des Alters der Patienten auf die Knochenregeneration festgestellt werden.

4 Diskussion

In der Zahnmedizin ist der Sinusbodenaugmentation als Goldstandard für die Schaffung eines Mindestangebotes an Knochen im Bereich der posterioren Maxilla. Für den dabei benötigten Knochen erwiesen sich Tricalciumphosphate (TCP) als bewährtes Knochenersatzmaterial, deren Verwendung eine sichere und fundierte Therapiemaßnahme darstellt (Knabe et al., 2011). In der Studie von Ohgushi wurde eine gute Knochenbindung von Trikalziumphosphaten und deren schnelle Biodegradation beschrieben. Auch für das partikuläre TCP Ceros[®] konnte in verschiedenen Studien eine gute Biokompatibilität und Osteoinduktivität im klinischen Einsatz bei Patienten nachgewiesen werden (Bednarek, 2011, Kluk, 2013, Stiller et al., 2014). Für die Beurteilung der Knochenneubildung kam die histomorphometrische Quantifizierung zum Einsatz, und für die Charakterisierung der osteoblastischen Zelldifferenzierung und Reifung des Knochengewebes wurden die Expression verschiedener osteogener Marker analysiert. Hierbei wurden die Expressionen einer Reihe von Knochenmatrixproteinen, die charakteristisch für unterschiedliche Phasen der Osteoblastendifferenzierung sind, bestimmt. Die Korrelation zwischen den Markerexpressionen in vitro und der Knochenregeneration in vivo konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (Knabe et al., 2004, Sun et al., 2006, Knabe et al., 2007, Knabe et al., 2011, Stiller et al., 2014, Zreiqat et al., 1996, Zreiqat und Howlett 1999). Sodek und Cheifetz belegten die Relevanz der Knochenmatrixproteine Collagen I (COL I), Alkalische Phosphatase (ALP), Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OC) und Bone Sialoprotein (BSP) als Marker der Osteogenese für die Charakterisierung der Zell- und Gewebsreifung des Knochens (Sodek und Cheifetz 2000). In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls die Marker ALP und COL I als Marker der frühen Phase und OC und BSP als Marker der späten Phase der osteoblastischen Zelldifferenzierung zur Charakterisierung der Reifung des neugebildeten Knochengewebes genutzt. Sie werden von Osteoblasten, Osteozyten und Mesenchymzellen exprimiert.

Durch die Untersuchung der histologisch bearbeiteten Biopate kann somit nicht nur eine Aussage über die Menge des neugebildeten Knochens und des verbliebenen β -TCPs getroffen werden, sondern auch über die Aktivität der Zell- und Gewebekomponenten und den Reifegrad des Knochens. Somit wird eine semiquantitative und quantitative Beschreibung der Biopsien durch immunhistologische und histomorphometrische Untersuchungen möglich.

In dieser Studie wurden zusätzlich zu den histologischen Untersuchungen erstmals auch die Einflüsse von Sexualhormonen, Geschlecht, Alter, Gewicht, Nikotinkonsum und

medikamentösen und anderen allgemeinanamnestischen Faktoren auf die Knochenregeneration untersucht. Hierfür wurden die Bioplate von 120 Patienten histologisch vermessen und ausgewertet. Anhand von Blutproben wurden die Sexualhormone bestimmt und mit Hilfe der anamnestischen Erhebung die für diese Studie klinisch relevanten Fragen beantwortet. Im Einzelnen ging es darum, den Einfluss dieser Faktoren auf die Knochenregeneration sowie auf die Gewebeintegration des Knochenersatzmaterials zu evaluieren.

Bei der Literaturrecherche konnten in der Zahnmedizin keine vergleichbaren Studien gefunden werden, die die verschiedenen Einflüsse von Sexualhormonen, Geschlecht, Gewicht und dem Nikotinkonsum in vivo untersuchten. In der Humanmedizin wurden zwar in tierexperimentellen Studien die Wirkung von Hormonen auf die Frakturheilung (Gesicki, 2005) und in Humanstudien im Rahmen der Osteoporosetherapie das Frakturrisiko bzw. die Knochendichtemessung (Lee et al., 2008 und Britto et al., 2011) erforscht und diskutiert, jedoch befassen sich die Autoren dabei lediglich mit einigen wenigen Faktoren. Die tierexperimentelle Studie von Gesicki (2005) an weiblichen und männlichen Mäusen hatte als Kernaussagen eine bessere Frakturheilung durch Sexualhormone, die signifikante Beschleunigung der Frakturheilung und die auch laut Gesicki nur scheinbar spezifische Wirkung der Hormone am Ort der Heilung. Sowohl Lee (2008) und Britto (2011) machten Studien an Frauen, wobei Lee zu dem Ergebnis kam, dass bei erhöhten SHBG-Werten und niedrigen Testosteronwerten die Hüftfrakturen zunahmen. Britto bestätigt mit ihren Erkenntnissen die Ergebnisse von Lee. Sie beobachteten durch die Gabe von Östrogen und Testosteron den schützenden Effekt auf den Knochen in der Menopause. In einigen weiteren tierexperimentellen Studien wurden jeweils die Hormoneinflüsse (Giro G. et al., 2008, März 2011, Juli 2011), der Nikotinkonsum (Carvalho et al., 2006) oder die Wirkung des Insulins (de Moraes et al., 2009) auf die Knochendichte um Titanimplantate untersucht. Auch dabei kam der positive Einfluss durch Östrogentherapien zum Ausdruck. Dass das Rauchen in Kombination mit Östrogenmangel einen negativen Effekt auf den Knochen hat, wurde in der Studie von Carvalho (2006) festgestellt. Eine Untersuchung des Einflusses des Alters und eines chirurgisch herbeigeführten Östrogenmangels auf den Knochen um Titanimplantate bei Ratten führten Duarte et al. (2005) durch. Dabei konnte eine altersabhängige und östrogenmangelbedingte Beeinträchtigung der Knochenformation gesehen werden. Lediglich eine tierexperimentelle Studie untersuchte den Effekt von Hormonen, und zwar von Wachstumshormonen, bei Hunden auf die initiale Knochenbildung bei Zahnimplantaten (Calvo-Guirado et al., 2011). Dabei konnte zwar kein signifikanter Einfluss auf den Knochen-Implantatkontakt gesehen, aber eine Steigerung der Knochenneubildung, vor allem

zwischen den zentral gelegenen Implantatwindungen, gemessen werden. Die oben genannten Studien untersuchten den Einfluss einzelner Faktoren, wie Geschlecht, Wirkung der Sexualhormone, Nikotin oder Gewicht auf die Knochenneubildung bzw. -dichte, aber in keiner dieser Studien wurde wie in der vorliegenden Studie der gleichzeitige Einfluss all dieser wichtigen Faktoren gemeinsam berücksichtigt. Offensichtlicher Grund für das Wissensdefizit ist der enorme histomorphometrische und immunhistochemische Aufwand bei einer großen Anzahl von Patienten unter nahezu identischen klinischen Ausgangsbedingungen. Eine solche Homogenität ist selbst durch Multicenterstudien nicht zu erreichen.

4.1 Studiendesign

Die Patienten wurden in einer niedergelassenen Praxis von einem Chirurgen mit langjähriger Erfahrung behandelt. Dabei wurde streng nach einem standardisierten Operationsprotokoll vorgegangen. Somit konnte auf Grund der Behandlung durch ein und denselben Chirurgen die für eine solche Studie so wichtige einheitliche und konstante Operationsqualität gewährleistet werden.

Die Entnahme der Knochenbiopate erfolgte nach einer Heilungsphase von 6 Monaten nach Sinusbodenaugmentation mit Tricalziumphosphat-Knochenersatzmaterial. Am gleichen OP-Termin wie die Biopsieentnahme erfolgten die Implantatinserktion und die Blutentnahme. Die Einheilung der Implantate verlief ohne Komplikationen. Somit konnten die Implantate nach dieser Einheilphase und dem Erreichen einer guten Primärstabilität anschließend prothetisch versorgt werden.

Die hier veranschlagte Einheilzeit von einem halben Jahr wurde in vielen klinischen Studien als angemessene Zeit definiert, um eine ausreichende Degradation des Knochenersatzmaterials und die Knochenneubildung für eine Implantation zu gewährleisten (Strietzel, 2004, Merten et al., 2001 und Wiltfang et al., 2003). Nach dieser Zeit können somit fundierte, aussagekräftige Angaben über histologische und osteogene Gewebsantworten gemacht werden.

Die histomorphometrisch und immunhistochemisch gewonnenen Daten wurden miteinander verglichen und in Zusammenhang mit den Sexualhormonen, dem Geschlecht, dem Gewicht der Patienten und ihrem Nikotinkonsum gebracht. Dabei wurden mehrere Parameter getrennt und in Abhängigkeit voneinander betrachtet. Es sollte untersucht werden, ob erhöhte oder verminderte Östrogen- und Testosteronwerte die Knochenregeneration positiv bzw. negativ beeinflussen.

Interessant war auch, ob der BMI und der Nikotinkonsum auf die Regeneration eine Auswirkung hatten.

4.2 Diskussion der histologischen Ergebnisse

In histologischen Untersuchungen konnte bereits die sehr gute Osseokonduktion, Knochenbindung und das hohe osteogenetische Potential (Szabo et al., 2001, Artzi et al., 2004, Knabe et al., 2008, 2011, Stiller et al., 2009, 2014) gute Biokompatibilität (Ohgushi et al., 1990), und eine gute Wirkung von β -TCPs auf die Osteogenese aufgezeigt werden. Auch in der vorliegenden Studie konnte die sehr gute Biokompatibilität und Umwandlung des Knochenersatzmaterials in neugebildeten Knochen bestätigt werden. Bei der Betrachtung der Biopsien in den Übersichtsaufnahmen konnte nach crestal (zum Boden des Sinus Maxillaris weisend) eine Restmenge an Eigenknochen gesehen werden. Im Verlauf der Biopsie von crestal nach apikal nahm der prozentuale Anteil des Knochens ab. Deshalb wurde, um sicher zu stellen, dass falsch negative Werte durch Positionierung des Meßareals zu weit apikal, d. h. nahe der Schneider'schen Membran und falsch positive Werte durch Einbeziehen des ortständigen Knochens ausgeschlossen werden, immer auf derselben Höhe ein definiertes Areal vermessen. Hierfür wurde immer ein Abstand von 3 mm zum Crestum eingehalten. Bei der Betrachtung des prozentualen Anteils des neu gebildeten Knochens, des verbliebenen Knochenersatzmaterials und des Bindegewebes in dem vermessenen Areal wurden deren Mittelwerte in Prozent für die verschiedenen Patientengruppen ermittelt und für die weiteren Analysen genutzt. Aufgrund der langjährigen Erfahrung des Operators konnten ideale Biopsien gewonnen werden, die für die spätere Vermessung die besten Voraussetzungen zeigten. Das ist im praktischen Alltag nicht immer gegeben. Ein großer Anteil der Gesamtpatientenpopulation umfasst Patienten mit schwierigen Knochenverhältnissen.

4.3 Diskussion der histomorphometrischen und der immunhistochemischen Ergebnisse

In zahlreichen in vivo Studien wurde die hohe Osteokonduktivität, der positive Einfluss auf die Knochenbildung und das günstige Degradationsverhalten von Tricalciumphosphaten belegt (Knabe et al., 2011, Buser et al., 1998, von Arx et al., 2001, Szabo et al., 2001). Diese Beobachtung wurde auch in klinischen Studien durch eine gute Osteokonduktivität von β -TCPs

(Knabe, 2008, Stiller, 2009, Bednarek, 2011) bestätigt und gerade auch für die Sinusbodenaugmentation bei Patienten anhand histologischer Ergebnisse von Patientenbiopsien belegt.

Auch in der vorliegenden Studie konnte eine gute Osteokonduktivität des β -TCP's in fast allen Biopaten durch den engen Ceros[®]-Knochenkontakt nachgewiesen werden. Durch statistische Analysen wurden die prozentualen Mittelwerte für die Menge an neugebildetem Knochen, verbliebenem Knochenersatzmaterial und des Bindegewebes histomorphometrisch ermittelt. Es erfolgte eine Einteilung der Patienten in verschiedene Gruppen, bei der ihre Mittelwerte miteinander verglichen wurden.

In histologischen Untersuchungen konnte bereits aufgezeigt werden, dass nach einer Sinusbodenaugmentation die Knochenneubildung immer vom ortständigen Knochen und nicht von der Schneider'schen Membran ausgeht (Knabe et al., 2008, Stiller et al., 2009 und Stiller et al., 2014). Dies wurde über die gesteigerte Markerexpression von apikal nach crestal nachgewiesen.

Die Expression von osteogenen Markern, d. h. den kollagenen und nicht-kollagenen Knochenmatrixproteinen COL I, Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin, Bone-sialoprotein und Alkalische Phosphatase durch die Knochenzellen lassen eine gute Beurteilung der Phasen der Osteogenese zu (Delmas et al., 2000), so dass eine Aussage über die zelluläre Aktivität und den Reifegrad des Knochens getroffen werden kann (Röser et al., 2000). Während COL I und ALP vor allem in der proliferativen Phase exprimiert werden, geschieht dies bei OC und BSP während der Mineralisation der knöchernen Matrix.

In dieser Studie wurden die Markerexpressionen in den unterschiedlichen Patientengruppen semiquantitativ ausgewertet. Dabei konnten in den verschiedenen Gruppen unterschiedliche Mittelwerte für die Expressionen der Marker festgestellt werden. Die immunhistologische Analyse der Biopsien in der vorliegenden Studie erfolgte semiquantitativ mittels der Bewertungsskala nach Knabe (2008).

Betrachtete man in der vorliegenden Studie nur eine Variable, ergab sich eine für die Geschlechtergruppen bessere Knochenneubildungen und Markerexpression zu Gunsten des männlichen Geschlechts. Dabei waren erhöhte Mittelwerte der Knochenbildung in der Gruppe der Männer im Vergleich zu den der Frauen zu sehen ($p = 0,21$). Es konnte auch eine stärkere Färbung der Marker in der Gruppe der Männer festgestellt werden. Diese ermittelten höheren

Mittelwerte zu Gunsten der Männer bestätigten die bereits in der Histomorphometrie erkannten Tendenzen, dass die Knochenneubildung in der Gruppe der Männer höher ist als in der Gruppe der Frauen.

Machte man nun eine weitere Einteilung nach BMI und Rauchverhalten, dann ergaben sich bessere Knochenregenerationen zugunsten der Patienten mit Übergewicht und den Nichtrauchern.

Wurde der Einfluss des Gewichts alleine auf die Knochenregeneration betrachtet, dann zeigte sich hier ab einem BMI von 25 eine höhere Tendenz zur Knochenneubildung zu Gunsten der Patienten mit Übergewicht als ohne Übergewicht, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,10$). Erst die Einteilung nach dem numerischen BMI Wert ergab hier einen signifikanten Einfluss in der Gesamtgruppe ($p = 0,03$) und bei Einteilung nach Geschlecht bestätigte sich der Vorteil zu Gunsten des männlichen Geschlechts ($p = 0,02$). In der Immunhistologie wurden alle Marker in der Gruppe der übergewichtigen Patienten unabhängig vom Geschlecht stärker exprimiert als bei den Patienten ohne Übergewicht.

In den Gruppen der Raucher und Nichtraucher konnte eine hohe Tendenz zur höheren Knochenregeneration in der Gruppe der Nichtraucher gesehen werden, auch wenn keine Signifikanz vorlag ($p = 0,09$). Bei dem Vergleich der Raucher mit den Nichtrauchern war die Proteinexpression auf Seiten der Nichtraucher bei allen Markern stärker ausgeprägt als bei den Rauchern. Durch alle diese gerade genannten verstärkten Markerexpressionen in den jeweiligen Gruppen konnte eine bessere Knochenregeneration zugunsten des männlichen Geschlechts, der übergewichtigen Patienten und der Nichtraucher festgestellt werden.

Die Betrachtung des Einflusses des Androgenindex auf die Knochenregeneration zeigte, wie oben erwähnt, bei den Frauen eine Abnahme der Knochenbildung bei steigendem FAI (F-Test, $p = 0,0098$), welches als statistisch hochsignifikant einzustufen ist. Aus endokrinologischer Sicht ist dieses Ergebnis jedoch biologisch nicht plausibel. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die zur Berechnung eingegangenen Testosteronserumkonzentrationen zwischen 0,1 und 0,05 und damit im unteren Bereich der Nachweisgrenze der Messmethode lagen, so dass dieser nicht veritable Befund der Abnahme der Knochenbildung bei steigendem FAI auf Artefakte durch die Messung zurückzuführen sein dürfte.

Die Spearman Korrelation und lineare Regressionsanalyse zeigte in der Gruppe der Männer eine signifikante positive Assoziation von Östradiolserumkonzentrationen (LogE_2) mit der

Knochenbildung. Bei der Gruppe der Frauen hatten hingegen höhere Östradiolwerte lediglich eine geringfügige Auswirkung auf die Knochenbildung, jedoch ohne jegliche statistische Signifikanz.

Bei der weiteren Betrachtung von zusätzlichen Parameterkombinationen miteinander konnte anhand von Mittelwerten festgestellt werden, dass übergewichtige, nichtrauchende Männer einen höheren Anteil an neugebildetem Knochen aufzeigten, als die übergewichtigen, nichtrauchenden Frauen. Bei der Betrachtung dieser beider Gruppen war zusätzlich zur Histomorphometrie auch in der Immunhistologie eine stärkere Markerexpression aller Marker bei den übergewichtigen, nichtrauchenden Männern zu sehen, als bei den übergewichtigen, nichtrauchenden Frauen. Dies zeigte wieder eine verstärkte Aktivität der Zell- und Matrixkomponenten zugunsten des männlichen Geschlechts.

Wurden nun die normalgewichtigen, nichtrauchenden Männer mit den normalgewichtigen, nichtrauchenden Frauen verglichen, schnitten die Männer wieder besser ab. Dadurch konnte wieder die Tendenz zur besseren Knochenregeneration zu Gunsten des männlichen Geschlechts aufgezeigt werden. Dies zeigte auch wieder eine verstärkte Aktivität der Zell- und Matrixkomponenten in der Immunhistologie zugunsten des männlichen Geschlechts.

Lediglich die Einteilung der Gruppe der Übergewichtigen in rauchende Männer und Frauen ergab, dass die übergewichtigen, rauchenden Frauen höhere Werte in der Knochenregeneration zeigten als die übergewichtigen, rauchenden Männer. Im Vergleich dieser beiden Gruppen ist zu sehen, dass das Rauchen den Vorteil des männlichen Geschlechts und des Übergewichts in der Knochenneubildung aufhebt und daher als ein die Knochenneubildung negativ beeinflussender Faktor betrachtet werden kann. In der Immunhistologie hatte die Gruppe der rauchenden Frauen mit Übergewicht in den COL I, ALP und BSP Färbungen stärkere Farbexpressionen als die rauchenden, übergewichtigen Männer. Somit konnte der negative Einfluss des Rauchens unabhängig vom Geschlecht nicht nur in der histomorphometrischen Auswertung gezeigt, sondern auch noch zusätzlich in der immunhistologischen Analyse bestätigt werden.

Die weiteren statistischen Analysen des prozentual verbliebenen Anteils an Knochenersatzmaterial konnten in Einklang mit vorausgegangenen Untersuchungen gebracht werden (Knabe et al., 2008, 2011, Stiller et al., 2014).

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Ziel der Studie war es, den Einfluss von Sexualhormonen, Geschlecht, BMI, Rauchverhalten und weiterer anamnestischer Parameter, auf die Knochenregeneration nach Sinusbodenaugmentation mit Einbringung eines β -TCPs nach 6 Monaten Heilungsdauer zu untersuchen. In vielen humanmedizinischen Studien konnte der positive Effekt von Sexualhormonen bzw. adäquaten Testosteron-, Östrogen- und SHBG-Serumkonzentrationen auf die Knochenneubildung bzw. auf die Knochenheilung untersucht und bestätigt werden. Für den craniofazialen Bereich der Kieferhöhlenregion konnte in der vorliegenden Studie lediglich ein positiver Effekt von höheren Östradiolserumkonzentrationen auf die Knochenregeneration bei älteren Männern festgestellt werden, welcher sich mit Erfahrungen aus der Orthopädie deckt.

Auch wenn keine Signifikanzen bezüglich des Geschlechts und des Rauchverhaltens nachgewiesen werden konnten, so waren doch unterschiedlich starke Tendenzen zugunsten der gesteigerten Knochenneubildung zu erkennen. Diese wichtigen Erkenntnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Vor allem die Gruppe der Männer hatte eine tendenziell bessere Knochenneubildung als die Gruppe der Frauen.

Die Gruppe der übergewichtigen Patienten wies unabhängig vom Geschlecht bessere Werte in Bezug auf die Knochenregeneration auf als die Patienten ohne Übergewicht. Betrachtete man zusätzlich zu der Variablen Übergewicht auch noch das Geschlecht, so war wieder die männliche der weiblichen Gruppe überlegen.

Das obige Muster zu Gunsten der übergewichtigen und männlichen Patienten bestätigte sich auch in der Gruppe der Nichtraucher. Wurde jedoch die Gruppe der Raucher betrachtet, waren die Männer, trotz Übergewicht, nicht mehr im Vorteil. Somit lässt sich zeigen, dass das Rauchen hier negativ wirkt, so dass es den Vorteil der Männer und des Übergewichtes in der Knochenneubildung komplett aufhebt.

Die Bedeutung des freien Androgenindex und dessen Einfluss auf die Knochenregeneration muss trotz der Signifikanzen im Geschlecht und in der Höhe des Androgenindex weiter untersucht werden.

Bezüglich des numerischen Östradiolwertes konnte in der Gruppe der 60 Männer eine Tendenz zur besseren Knochenregeneration festgestellt werden. In weiteren Studien sollten

Untersuchungen erfolgen, um zu kontrollieren, ob bei einer größeren Anzahl an Männern mit pathologischen Östradiolwerten Tendenzen wie in der vorliegenden Studie mit den numerischen Werten bestätigt werden können. Dabei sollte untersucht werden, ob erhöhte Östradiolwerte die Tendenz zur besseren Knochenregeneration bestätigen und geringere Werte entsprechend die Knochenregeneration verringern. Ferner sollte der Einfluss von pathologisch verminderten und erhöhten Östrogenwerten bei Frauen auf die Knochenregeneration in zukünftigen Studien durch Vergrößerung der Patientengruppen weiter untersucht werden.

Trotz der großen Anzahl an Patienten für eine klinische, zahnmedizinische Studie, waren bei der Einteilung und Betrachtung von einzelnen Gruppen Limitierungen in den Auswertungen durch die Gruppengrößen vorhanden.

Wurde der Einfluss des Östrogens auf die Knochenregeneration in der Gruppe der Männer mit pathologischen und nichtpathologischen Werten betrachtet, entstanden so zwei Gruppen, bei der die eine aber nur aus vier Personen bestand. Eine weitere Einteilung der kleinen Gruppe nach Höhe des Östrogenwertes wäre somit ohne Aussagekraft.

Die Betrachtung des Einflusses eines erhöhten oder verringerten Testosteronwertes auf die Knochenbildung war nicht sinnvoll, da es in diesen beiden Gruppen jeweils nur vier Patienten gab.

Bezüglich des Einflusses von verringertem SHBG auf die Knochenbildung lagen lediglich Werte von 2 Patienten vor.

Betrachtete man einige anamnestische Punkte, wie die Menopause der Frauen, so waren lediglich 9 Patientinnen von 60 noch nicht in der Menopause. Diese kleine Gruppe ist auch durch die Tatsache bedingt, dass erst mit steigendem Alter und dem dadurch eher zu erwartenden Zahnverlust, der Wunsch nach einer Implantationstherapie besteht. Daher wird auch in zukünftigen Studien die Gruppenverteilung der zur Verfügung stehenden Patienten eine anhaltende Schwierigkeit darstellen. Die Gesamtpatientenzahl von 120 in der vorliegenden Studie für eine zahnmedizinische Studie schon recht hoch.

Anamnestische Punkte wie zum Beispiel Vitamin D, Calcium und Magnesium Einnahme lassen durch die geringe Patientenanzahl, keine ausreichende Aussage über deren Einfluss auf die Knochenregeneration zu.

Da in der vorliegenden Studie eine Reihe von Aspekten bezüglich des Einflusses von Testosteron und Östradiol nicht abschließend geklärt werden konnte, wäre es wünschenswert, diesen Aspekten anhand von größeren Patientenzahlen nachzugehen.

Der Einfluss der Sexualhormone auf die Knochenregeneration konnte in vielen tierexperimentellen Studien durch das Hinzufügen oder Reduzieren von Hormongaben (Giro et al., 2008, Giro et al., 2011) direkt forciert werden. Durch diese gezielte Beeinflussung des Hormonhaushaltes konnten gleichmäßig große Gruppen gebildet und anschließend noch mal in Gruppen mit ähnlichen Hormonwerten eingeteilt und betrachtet werden. Allerdings wurden diese Untersuchungen nur an Mäusen durchgeführt. Interessanter war hier die Übertragung in eine zahnmedizinische Humanstudie wie die vorliegende. Die Gruppen der Patienten, die im Rahmen einer Osteoporosetherapie oder zur Behandlung von Menopausesympomen eine Hormonsubstitution erhielten, waren zu klein und zeigten daher auch keine aussagekräftigen Ergebnisse und trotzdem konnten hier bereits Tendenzen erkannt werden. So wurden zum Beispiel nur sehr wenige Männer mit Hormonen behandelt und trotzdem konnte bei dem gemessenen Hormonstatus eine Tendenz zu Gunsten des männlichen Geschlechts mit steigenden Östradiolwerten beobachtet werden. In der jüngsten Zeit nimmt daher auch die Problematik der Osteoporose bei älteren Männern an Bedeutung zu. In den USA leiden von 10 Millionen Menschen der über 50-jährigen, 1-2 Millionen Männer an einer Osteoporose mit einer steigenden Tendenz zur Abnahme der Knochendichte (Cauley et al., 2010). Es wird vermutet, dass das Östrogen auch bei Männern mit Osteoporose wichtige Effekte auf die Stabilität des Knochens hat (Riggs et al., 1998, Szulc et al., 2001, Bouillon et al., 2004, Clapauch et al., 2009, Cauley et al., 2010, Ho-Pham et al., 2014).

Es liefen zwar Studien in der Humanmedizin an osteoporotischen Frauen in Bezug auf ein erhöhtes Hüftfrakturrisiko bzw. auf die Knochendichtemessung nach Hormonsubstitution über einen längeren Zeitraum mit einer großen Anzahl an Patienten, aber diese befassten sich lediglich mit einzelnen Parametern und waren beschränkt auf osteoporotische Frauen. Leider wurde in diesen Studien auf weitere Unterteilungen der Gruppen verzichtet. In der jetzt vorliegenden Studie wurde aber deutlich, dass bei weiteren Unterteilungen Signifikanzen bzw. Hinweise auf Tendenzen geliefert wurden. Die Studie von Lee et al. (2008) umfasste 800 Patientinnen, eingeteilt in zwei Gruppen à 400 Personen und ging über einen Zeitraum von 7 Jahren. In dieser Studie wurden die Sexualhormone Östrogen und Testosteron und das SHBG getrennt voneinander und in Zusammenhang miteinander betrachtet. Dabei konnte festgestellt werden, dass mit steigenden SHBG Werten, unabhängig von Östrogen und Testosteron, das

Risiko von Hüftfrakturen anstieg. Das Testosteron hingegen wirkte unabhängig von Östrogen und SHBG risikomindernd auf Hüftfrakturen. Lediglich Östrogen konnte als alleinigem Parameter kein Einfluss auf das Risiko von Hüftfrakturen nachgewiesen werden. Ein weitaus interessanterer Aspekt war, dass auch in dieser Studie ein höheres Risiko für Hüftfrakturen bei Patienten mit geringerem Gewicht bzw. BMI und Rauchern beobachtet werden konnte. Der negative Effekt des Rauchens und des geringeren Gewichtes in Bezug auf die Knochenneubildung trat auch in der vorliegenden Studie hervor. Eine weitere interessante Fragestellung für zukünftige Studien wäre, ob neben der offensichtlich lokalen Einwirkung des Nikotins über die Kieferhöhlenschleimhaut auch eine systemische Wirkkomponente des Nikotins vorhanden ist. Hinweise darauf gibt es bereits in der Ratten-Studie von Carvalho (2006), der über eine Inhalationskammer die Effekte des Nikotins auf die Entwicklung des periimplantären Knochens an Ratten ermitteln konnte.

Die Studie von Britto et al. (2011) hatte eine geringere Anzahl an Patientinnen und lief nur ein Jahr, konnte aber durch direkte Hormonzufuhr mit Östrogen und Testosteron an Frauen in der Menopause den Hormonhaushalt gezielt beeinflussen und damit die Knochendichte verbessern. Die erste Gruppe mit 34 Frauen wurde mit Hormonen behandelt, die zweite Gruppe mit 27 Frauen nicht. Dabei wiesen die Frauen mit Hormonsubstitution aus Östrogen und Testosteron eine bessere Knochendichte auf als die Kontrollgruppe ohne Hormontherapie. Sie zeigten damit auf, dass die Kombination aus Östrogen und Testosterontherapie einen Schutz auf den Knochen bei postmenopausalen Frauen bewirkt. Aber auch hier ist wie in der Studie von Lee die Patientenauswahl durch die geringe Kriterienwahl stark eingeschränkt.

In die vorliegende Studie sollten möglichst viele Parameter mit einbezogen werden. Daher wurden weder Männer aus der Studie ausgeschlossen noch nach anamnestischen Grunderkrankungen selektiert. Ferner wurden sowohl Raucher als auch stark übergewichtige Patienten mit in die Studie einbezogen. In der vorliegenden Studie wurden die Patienten im Rahmen des Sinusbodenaugmentation nicht zusätzlich mit Hormonen behandelt, sondern lediglich der Hormonstatus am Tag der Implantation bestimmt. Die Wichtigkeit des Verhaltens der Patienten nach operativen Eingriffen, z. B. der negative Einfluss des Rauchens auf den gesamten Körper, ist in dieser Studie verdeutlicht worden. Der signifikante Einfluss des BMIs auf die Knochenregeneration wie in der Orthopädie konnte hier auch für den zahnmedizinischen Bereich in der vorliegenden Studie bewiesen werden.

Die desmale Ossifikation im Bereich der Kieferhöhle in Abhängigkeit der Sexualhormone wurde in der Zahnmedizin bisher in keiner Humanstudie untersucht, sondern erstmals in der vorliegenden Studie. Die Studie von Calvo-Guirado (2011) betrachtete zwar auch Bereiche der desmalen Ossifikation, aber lediglich unter dem Einfluss von Wachstumshormonen auf die Knochenneubildung um Zahnimplantate bei Hunden im Unterkiefer.

In einigen tierexperimentellen Studien und in einigen Humanstudien im Rahmen der Osteoporosetherapie konnte der positive Effekt von Sexualhormonen auf die Knochenregeneration im Rahmen der chondralen Ossifikation nachgewiesen werden. Für die desmale Ossifikation konnte in der vorliegenden Studie jedoch dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden, was auf Unterschiede des Einflusses von Sexualhormonen zwischen desmaler und chondraler Ossifikation hinweist. Diese Unterschiede zwischen den hormonellen Regulationsmechanismen der desmalen und chondralen Ossifikation sind somit noch nicht geklärt und müssen in weiterführenden Studien untersucht werden.

Da eine Hormonsubstitution, deren Nutzen und Nebenwirkungen auf den gesamten Körper beachtet werden müssen, in der Humanmedizin aus allgemeinmedizinischer Sicht einer strengen Indikationsstellung bedarf, sollte man in der Zahnmedizin, um lediglich den Wunsch nach feststehendem Zahnersatz zu realisieren, die Überlegung zum Einsatz von zusätzlichen Hormonen kritisch hinterfragen.

Alle bisherigen vorangegangenen tierexperimentellen Studien hatten eingeschränkte Gruppeneinteilungen. So wurde entweder nach Geschlecht unterschieden oder es wurden nur Gruppen mit weiblichen Tieren unter Beachtung des Gewichts in die Studien einbezogen. Der Einfluss des Nikotins durch eine Inhalationskammer wurde in einer Studie nur an weiblichen Tieren durchgeführt. Hormongaben konnten im Gegensatz zur vorliegenden Studie gezielt eingesetzt werden. Die vorliegende Studie zeigt, dass offensichtlich neben der systemischen Einwirkung des Nikotins auch noch eine lokale Wirkkomponente über die Kieferhöhlenschleimhaut vorhanden sein muss. Hinweise dafür bietet auch die Studie von Carvalho (2006), der über eine Inhalationskammer die Effekte des Nikotins auf die Entwicklung des periimplantären Knochens an Ratten ermitteln konnte.

Zukünftigen größeren Humanstudien in der Zahnmedizin mit einer größeren Patientenzahl müsste eine tierexperimentelle Studie vorangehen. Dabei sollten die Tiere in dieselben Gruppen eingeteilt werden, wie später die Menschen auch. Diese Einteilung sollte nach Geschlecht, Gewicht und der Nikotininhalation erfolgen. In der tierexperimentellen Studie gäbe es zusätzlich

die Möglichkeit zu festgelegten Zeitpunkten Biopsien zu entnehmen und zeitgleich Blutentnahmen zur Hormonbestimmung durchzuführen, zusätzlich zu den Blutentnahmen zur Hormonverlaufskontrolle. Es wäre sinnvoll, dass eine weitere Gruppe an Tieren zusätzlich mit Hormonen behandelt wird, weil in dieser Gruppe die Hormonsubstitution gezielt beeinflusst werden kann. Die morphometrischen Ergebnisse der tierexperimentellen Studie und der eventuell festzustellende Einfluss der Sexualhormone kann mit volumetomographischen Untersuchungen kontrolliert werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist in nachfolgenden Humanstudien darauf zu achten, den Hormonstatus am Tag der Sinusbodenelevation und am Tag der Biopsieentnahme zu bestimmen, um eventuelle Hormonschwankungen im Laufe der Heilungsphase festzustellen.

Da die Erfahrungen in der Praxis gezeigt haben, dass Patienten durch persönliche Umstände teilweise längere Zeiten bis zur Implantation verstreichen lassen, könnte dieser Umstand der länger dauernden Knochenregeneration dazu genutzt werden, um Gruppen zu bilden, bei denen die Biopsieentnahme zu einem festgelegten späteren Zeitpunkt erfolgt. Somit könnte eine Vergleichsgruppe mit einer prolongierten Knochenaufbauphase nach z. B. 8 Monaten erstellt werden.

Bei der Literaturrecherche in der Zahnmedizin wurde keine Studie gefunden, die sich mit einer so großen Anzahl an Patienten und Beachtung von Variablen und Parametern und deren Einfluss auf die Knochenregeneration nach Sinusbodenaugmentation befasst wie die vorliegende Studie, daher kann auch kein Literaturbezug hergestellt werden.

Es wurden das erste Mal konstitutionelle Aspekte in der Immunhistologie untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Knochenheilung bei Männern besser ist als bei Frauen. Auch der positive Einfluss des Übergewichts auf die Regeneration ist bei dieser Studie deutlich hervorgetreten. Ein dritter, sehr wichtiger Aspekt ist der negative Einfluss des Rauchens auf die Knochenregeneration nach einer Sinusbodenaugmentation. Die oben genannten Aspekte sollte bei zukünftigen Implantation mit vorangegangener Sinusbodenelevation immer beachtet werden. Das bedeutet, dass bei sehr zierlichen und schlanken Frauen evtl. nach Sinusbodenaugmentation etwas länger als nur 6 Monaten mit der Implantatinserterion gewartet werden sollte, da bei diesen die Knochenneubildung im Vergleich zu den übergewichtigen Frauen länger anzudauern scheint. Auch sollten die Patienten darauf hingewiesen werden, dass das Rauchen die Knochenneubildung negativ beeinflusst. Denn neben dem systemischen Effekt des Rauchens ist

hier vor allem der lokale Effekt im Bereich der Mund- und Nasennebenhöhle und damit eine direkte negative Nikotineinwirkung zu erkennen.

Daher sollten die Patienten während der Knochenregenerationsphase in den 6 Monaten das Rauchen einstellen.

6 Zusammenfassung

Hintergrund

Ziel der vorliegenden Studie war es die Zusammenhänge zwischen konstitutionellen Faktoren wie dem Geschlecht, dem Body-Mass-Index (BMI), dem Rauchverhalten und der hormonellen Situation auf die Knochenregeneration nach Knochenersatzmaterialanwendung im craniofazialen Bereich zu untersuchen.

Material und Methoden

Wir führten eine prospektive Studie durch, bei der 60 Männer und 60 Frauen im Rahmen einer zweizeitigen Sinusbodenelevation Zahnimplantate erhielten. Bei dem Re-entry nach 6 Monaten wurde der anfallende Knochen aus den Kieferabschnitten histomorphometrisch und immunhistochemisch untersucht. Zeitgleich mit dem operativen Eingriff wurde der BMI erhoben, der Nikotinkonsum erfragt und eine Bestimmung von Östradiol, Testosteron und SHBG mittels Radioimmunoassay und Elektrochemolumineszenzimmunoassay durchgeführt sowie der Androgenindex ermittelt.

Ergebnisse

Übergewichtige Patienten mit steigendem BMI (>25) zeigten eine signifikant höhere ($p = 0,0255$) Knochenregeneration und wiesen stärkere Markerexpressionen auf als nicht übergewichtige Patienten. Dieser Unterschied konnte vor allem in der Gruppe der Männer mit einem statistisch signifikanten p -Wert von $0,0301$ bei den übergewichtigen Männern festgestellt werden. Wohingegen in der Gruppe der Frauen dieser Unterschied nicht signifikant war. Die Spearman Korrelation und die lineare Regressionsanalysen zeigten signifikante Assoziationen zwischen der Östradiolserumkonzentrationen (Log E2) und der Knochenregeneration bei den Männern auf. Ferner zeigten die Nichtraucher im Vergleich zu den Rauchern mit einem p -Wert von $0,0957$ eine hohe Tendenz der Knochenregeneration und der osteogenen Markerexpressionen. Es konnte auch ein leichter, aber nicht signifikanter Trend ($p = 0,21$, Wilcoxon U-Test) zur besseren Knochenregeneration in der Gruppe der Männer gegenüber den der Frauen festgestellt werden.

Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie können erstmals im klinisch-histologischen Vergleich geschlechtstypische und konstitutionelle Besonderheiten für den desmalen Ossifikations- und Regenerationsmodus nachgewiesen werden. Es scheint, dass bezüglich des knöchernen regenerativen Potentials Männer gegenüber den Frauen im Vorteil sind. Trotz des Wissens um die negativen Wirkungen eines erhöhten BMI scheint dieser im höheren Lebensalter einen positiven Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit des Knochens zu haben. Ferner konnte zwar ein negativer Einfluss des Rauchens auf die Knochenregeneration beobachtet, aber statistisch nicht signifikant belegt werden.

Summery

Background

The aim of the present study was to investigate the relationships between constitutional factors as sex, body mass index (BMI), smoking behavior and the hormonal situation in bone regeneration using bone substitute materials in craniofacial area.

Materials and Methods

We conducted a prospective study in which 60 men and 60 women were given as part of a two-stage sinus lift procedure dental implants. In the re-entry after 6 months the accumulating bone of the jaw sections was examined by histomorphometry and immunohistochemistry. Coinciding with the surgery the BMI was evaluated, inquired of nicotine consumption and performed a measurement of estradiol, testosterone and SHBG by radioimmunoassay and Eleetrochemolumineszenzimmunoassay and the androgen index.

Results

Obese patients with increasing BMI (> 25) showed a significant higher bone regeneration ($p = 0.0255$) and greater marker Expressions than non-obese patients. This difference could be observed mainly in the group of men with a statistically significant p-value of 0.0301 in the overweight men. Whereas in the group of women this difference was not significant. The Spearman correlation and linear regression analysis revealed significant associations between the estradiol serum levels (Log E2) and of bone formation in men. In addition, the non smokers showed compared to smokers with a p-value of 0.0957 to a high tendency in bone regeneration

and the osteogenic marker expression. There was also found a slight, but not significant trend ($p = 0.21$, Wilcoxon U test) for better bone formation in the group of men compared to women.

Conclusions

The present study initially verified in a clinical-histological comparison gender-typical and constitutional aspects for the intramembranous ossifications and regenerations modus. It seems that with respect to the osseous regenerative potential men towards women at an advantage. Despite the knowledge of the negative effects of increased BMI it seems that BMI has a positive impact on the regenerative capacity of the bone in the elderly. Furthermore, it was observed a negative but non statistically significant influence of smoking on bone regeneration.

7 Literaturverzeichnis

Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE. The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Oct;82(10):3493-7.

Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, Tal H. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004 May-Jun;19(3):357-68.

Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol.* (1998) 76(6):899-910.

Aubin JE (2000). Osteogenic Cell Differentiation. In: Bone engineering. J.E. Davies editor. Toronto: em squared inc., pp. 19-30.

Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord.* (2001 Jan) 2(1):81-94.

Bednarek Alina: Vergleichende Untersuchungen unterschiedlicher Tricalciumphosphatpartikulate zur Kieferkammaugmentation – eine histomorphometrische und immunhistochemische Studie. Med Diss. 2011 Berlin.

Benz DJ, Haussler MR, Thomas MA, Speelman B, Komm BS. High-affinity androgen binding and androgenic regulation of alpha 1(I)-procollagen and transforming growth factor-beta steady state messenger ribonucleic acid levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology.* 1991 Jun; 128(6):2723-30.

Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE. Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts in vivo. *Bone.* (1996 Jul) 19(1):35-40.

Bouillon R, Bex M, Vanderschueren D, Boonen S: Estrogens are essential for male pubertal periosteal bone expansion. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(12):6025-6029.

Britto R, Araújo L, Barbosa I, Silva L, Rocha S, Valente AP : Hormonal therapy with eostradiol and testosterone implants: bone protection. *Gynecol Endocrinol*. 2011 Feb; 27(2):96-100.

Buchbinder R, Osborne RH, Ebeling PR, Wark JD, Mitchell P, Wriedt C, Graves S, Staples MP, Murphy B. A randomized trial of vertebroplasty for painful osteoporotic vertebral fractures. *N Engl J Med*. 2009 Aug 6;361(6):557-68.

Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK. Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Impl Res* 1998;9:137-150.

Calvo-Guirado JL, Mate-Sanchez J, Delgado-Ruiz R, Ramirez-Fernández MP, Cutando-Soriano A, Peña M.: Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Jun;22(6):587-93.

Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med*. 1997 Jul 10;337(2):91-5.

Carvalho MD, Benatti BB, César-Neto JB, Nociti FH Jr, da Rocha Nogueira Filho G, Casati MZ, Sallum EA.: Effect of cigarette smoke inhalation and estrogen deficiency on bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *J Periodontol*. 2006 Apr;77(4):599-605.

Cauley JA, Ewing SK, Taylor BC, Fink HA, Ensrud KE, Bauer DC, Barret-Conner E, Marshall L, Orwoll ES (2010). Sex steroid hormones in older men: longitudinal associations with 4.5-year change in hip bone mineral density - the osteoporotic fractures in men study. *J Clin Endocrinol Metab* 95:4314-4323.

Chang CS, Kokontis J, Liao ST. Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988 Oct; 85(19):7211-5.

Chang Eun Mi, Kim You Shin, Won Hyung Jea, Yoon Tae Ki, Kee Woo Sik (2013) Association Between Sex Steroids, Ovarian Reserve, and Vitamin D Levels in Healthy Nonobese Women. Doi: 10.1210/jc.2013-3873.

Cheng, Bi-Hua; Chu, Tien-Min G.; Chang, Chawnshang; Kang, Hong-Yo; Huang, Ko-En (2013): Testosterone delivered with a scaffold is as effective as bone morphologic protein-2 in promoting the repair of critical-size segmental defect of femoral bone in mice. In: PLoS One 8 (8), S. e70234. DOI: 10.1371/journal.pone.0070234.

Cuenin MF, Billmann, MA, Kudryk VL, Hanson BS. Estrogenic hormones and dental implant therapy: the effects of estrogen and progesterone levels on osseointegration of dental implants. *Mil Med.* 1997 Sep;162(9):582-5.

Cummings SR, Browner WS, Bauer D, Stone K, Ensrud K, Jamal S, Ettinger B. Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med.* 1998 Sep 10;339(11):733-8.

de Morais JA, Trindade-Suedam IK, Pepato MT, Marcantonio E Jr, Wenzel A, Scaf G.: Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Aug;20(8):796-801.

Debrunner A.M. Orthopädie, Orthopädische Chirurgie. Verlag Hans Huber 3. Auflage, 29, 335 (1994).

Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J; Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation]. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int.* 2000;11 Suppl 6:S2-17.

Delling G, Hahn M, Vogel M. Neuere Vorstellungen zur Struktur des Knochengewebes und zur Entwicklung der Osteoporose. *Med Welt* 1992; 43: 176-180.

Duarte PM, Gonçalves PF, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr.: Age-related and surgically induced estrogen deficiencies may differently affect bone around titanium implants in rats. J Periodontol. 2005 Sep;76(9):1496-501.

Ducheyne P, Cuckler JM. Bioactive ceramic prosthetic coatings. Clin Orthop Relat Res. 1992 Mar;(276):102-1.

Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. Biomaterials. 1999 Dec;20(23-24):2287-303.

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. J Clin Endocrinol Metab. 1997 Dec; 82(12):4258-65.

Evans SF, Davie MW. Low Body Size and Elevated Sex-Hormone Binding Globulin Distinguish Men with Idiopathic Vertebral Fracture. Charles Salt Centre Robert Jones and Agnes Hunt Orthopaedic Hospital, Oswestry, Shropshire, SY107AG, UK. Calcif Tissue Int. 2002 Jan;70(1):9-15. Epub 2001 Dec 21.

Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. J Clin Invest. 2000 Dec;106(12):1553-60.

Fiene Cornelia: Veränderungen des Knochenstoffwechsels nach Knochenmark- und hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Med Diss. 2010 Berlin.

Franceschi RT. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. Crit Rev Oral Biol Med. 1999; 10(1):40-57.

Frankle M, Borrelli J. The effects of testosterone propionate and methenolone enanthate on the healing of humeral osteotomies in the Wistar rat. J Invest Surg. (1990) 3(2):93-113.

Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Cruceta J, Graves BD, Einhorn TA. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells Tissues organs*. 2001;169(3):285-94.

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*. 2003 Apr 1;88(5):873-84. Review.

Gesicki Marco: Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss der Sexualhormone Östrogen und Testosteron auf die Frakturheilung. Med Diss. 2005 Hamburg.

Giro G, Gonçalves D, Sakakura CE, Pereira RM, Marcantonio Júnior E, Orrico SR.: influence of estrogen deficiency and its treatment with alendronate and estrogen on bone density around osseointegrated implants: radiographic study in female rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Feb; 105(2):162-7.

Giro G, Coelho PG, Pereira RM, Jorgetti V, Marcantonio E Jr, Orrico SR.: The effect of oestrogen and alendronate therapies on postmenopausal bone loss around osseointegrated titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Mar; 22(3):259-64.

Giro G, Coelho PG, Sales-Pessoa R, Pereira RM, Kawai T, Orrico SR.: influence of estrogen deficiency on bone around osseointegrated dental implants: an experimental study in the rat jaw model. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Jul;69(7):1911-8.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 1986 Mar 13-19;320(6058):134-9.

Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Hammond GL, Catalano MG, Muller YA. Steroid ligands bind human sex hormone-binding globulin in specific orientations and produce distinct changes in protein conformation. *J Biol Chem*. (2002 Aug 30) 277(35):32086-93.

Giuca MR, Giannotti L, Saggese R, Vanni A, Pasini M. Evaluation of cephalometric, hormonal

and enzymatic parameters in young obese subjects. *Eur J Paediatr Dent*. 2013 Sep;14(3):175-80.

Helf Christian: Herstellung von Polymethacrylat/Calciumphosphat-Implantatwerkstoffen durch den 3D-Pulverdruck. Med Diss. 2009 Würzburg.

Hipp, Ina Maria Leonore: Einfluss von Oberflächenstrukturierung und Oberflächenbeschichtung bei neuartigen Verbund-Keramikimplantaten auf die knöcherne Integration am Schafmodell – eine histomorphologische Untersuchung. Med Diss. 2012 München.

Ho-Pham LT, Nguyen ND, Nguyen TV. Quantification of the relative contribution of estrogen to bone mineral density in men and women. *BMC Musculoskelet Disord*. 2013 Dec 23;14:366.

Hoppé E, Bouvard B, Royer M, Audran M, Legrand E. Sex hormone-binding globulin in osteoporosis. *Joint Bone Spine*. 2010 Jul;77(4):306-12. doi: 10.1016/j.jbspin.2010.03.011. Epub 2010 May 8. Review.

Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*. (1996 Oct) 2(10):1132-6.

Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*. 1992 Jul 3; 257(5066):88-91.

Jockenhövel F. [What is the function of estrogen receptors in the prostate?]. *Urologe A*. 2003 Jan; 42(1):97.

Kasperk CH, Wergedal JE, Farley JR, Linkhart TA, Turner RT, Baylink DJ. Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology*. 1989 Mar; 124(3):1576-8.

Kasperk CH, Wakley GK, Hierl T, Ziegler R. Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism in vitro. *J Bone Miner Res*. 1997 Mar;12(3):464-71.

Kim HJ, Rice DP, Kettunen PJ, Thesleff I. FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development*. 1998 Apr;125(7):1241-51.

Kluk Esther: Einfluss eines Trikalziumphosphatgranulats mit einheitlicher Korngröße sowie eines Trikalziumphosphatputtys mit einem Gemisch von Granula unterschiedlicher Korngröße auf die Osteogenese und nach beidseitiger Sinusbodenaugmentation – ein Vergleich anhand einer randomisierten klinischen Studie mit Split-Mouth-Design. Med Diss. 2013 Berlin.

Knabe C, Berger G, Gildenhaar R, et al.: Effect of rapidly resorbable calcium phosphates and a calcium phosphate bone cement on the expression of bone-related genes and proteins in vitro. *J Biomed Mater Res A* 69 (1) (2004), 145-54.

Knabe C, Nicklin S, Yu Y, et al. Growth factor expression following clinical mandibular distraction osteogenesis in humans and its comparison with existing animal studies. *J Craniomaxillofac Surg* (2005) 33: 361-369.

Knabe C, Kraska B, Koch C, Gross U, Zreiqat H, Stiller M. A method for immunohistochemical detection of osteogenic markers in undecalcified bone sections. *Biotech Histochem*. 2006 Jan-Feb;81(1):31-9.

Knabe C, Berger G, Gildenhaar R, et al.: Effect of rapidly resorbable calcium-alkali-orthophosphate bone substitute materials on osteogenesis and osteoblastic phenotype expression in vivo. Transactions 32nd Annual Meeting of the Society for Biomaterials, 18-21 April 2007, Chicago, Illinois, USA, p. 262.

Knabe C, Houshmand A, Berger G, et al.: Effect of rapidly resorbable bone substitute materials on the temporal expression of the osteoblastic phenotype in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Mar 15; 84 (4): 856-68.

Knabe C, Koch C, Rack A, Stiller M. Effect of beta-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials*. 2008 May;29(14):2249-58.

Knabe C, Stiller M, Ducheyne P. Dental graft materials. In: „Comprehensive Biomaterials“, Volume 6, Chapter 6.620. P Ducheyne, K. Healy, D. Hutmacher, D.W. Grainger, J.P. Kirkpatrick, editors. Elsevier, Oxford, UK, 2011, p. 305-324.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):5925-30.

Kurihara N, Suda T, Miura Y, Nakauchi H, Kodama H, Hiura K, Hakeda Y, Kumegawa M. Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells. *Blood*. (1989 Sep) 74(4):1295-302.

Lee JS, LaCroix AZ, Wu L, Cauley JA, Jackson RD, Kooperberg C, Leboff MS, Robbins J, Lewis CE, Bauer DC, Cummings SR. Associations of serum sex hormone-binding globulin and sex hormone concentrations with hip fracture risk in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. (2008 May) 93(5):1796-803.

Legrand E, Hedde C, Gallois Y, Degasne I, Boux de Casson F, Mathieu E, Baslé MF, Chappard D, Audran M. Osteoporosis in men: a potential role for the sex hormone binding globulin. *Bone*. 2001 Jul;29(1):90-5.

Löffler, Georg. Funktionelle Biochemie. Strukturformel von Testosteron. 2.Auflage. 1993/94. S. 370.

Löffler, Georg. Funktionelle Biochemie. Strukturformel von Östrogen. 2.Auflage. 1993/94. S. 371.

Löffler, Georg. Funktionelle Biochemie. Funktion von FSH und LH. 2.Auflage. 1993/94. S. 372-373).

Löffler, Georg. Funktionelle Biochemie. Biosynthese der Androgene und Östrogene aus Cholesterin. 2.Auflage. 1993/94. S. 370-371.

Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J, Higgs HN, Larson RE, French FS, Wilson EM. The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol*. 1988 Dec;2(12):1265-75.

Lüllmann-Rauch, Renate. Taschenlehrbuch Histologie. Thieme Verlag, 2.Auflage, S.156-161 (2006).

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000 Apr;21(2):115-37.

Merten HA, Wiltfang J, Grohmann U, Hoenig JF. Intraindividual comparative animal study of alpha- and beta-tricalcium phosphate degradation in conjunction with simultaneous insertion of dental implants. *J Craniofac Surg*. 2001 Jan;12(1):59-68.

Monaghan BA, Kaplan FS, Lyttle CR, Fallon MD, Boden SD, Haddad JG. Estrogen receptors in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. (1992 Jul) (280):277-80.

Morgan TG, Bostrom MP, van der Meulen MC. Tissue-level remodeling simulations of cancellous bone capture effects of in vivo loading in a rabbit model. *J Biomech*. 2015 Mar 18;48(5):875-82. doi: 10.1016/j.jbiomech.2014.12.011. Epub 2014 Dec 29.

Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Dec;80(12):3689-98.

Mundy GR. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Mar;(324):24-8.

Neumann F, Schenck B, Schleusener H, Schweikert HU (1992) Endokrinpharmakologie. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (eds) *Pharmakologie und Toxikologie*. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, pp 528-579.

Niethard F.U., Pfeil J. Orthopädie. Thieme Verlag 5. Auflage, S.144-174 (2005).

Niethard F.U., Pfeil J. Orthopädie. Thieme Verlag 5.Auflage, S.149 (2005).

Notelovitz M. Androgen effects on bone and muscle. Fertil Steril. 2002 Apr;77 Suppl 4:S34-41.

Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Shors EC, Caplan AI: Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. J Biomed Mater Res 24 (12) (1990), 1563-70.

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol. 1990 Jun; 143(3):420-30.

Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res. 1996 Aug; 11(8):1043-51.

Porst H. Klimakterium virile - Wirklichkeit oder Fiktion. Bayer Ärzteblatt 4:159- 66, 2000.

Riede U.N., Werner M., Schäfer H.E. Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme Verlag 5. Auflage, 163-335 (2004).

Riegel, Christian: Hormonelle Veränderungen bei Männern mit Osteoporose mit speziellem Interesse bezüglich des Hypophysen-Hypothalamus GH/IGF-1-Systems. Med Diss. 2009 Würzburg.

Riggs BL, Melton LJ 3rd. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. Bone. 1995 Nov; 17(5 Suppl):505S-511S.

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. J Bone Miner Res 1998; 13: 763-773.

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. Endocr Rev. 2002 Jun; 23(3):279-302.

Röser K, Johansson CB, Donath K, Albrektsson T. A new approach to demonstrate cellular activity in bone formation adjacent to implants. *J Biomed Mater Res*. 2000 Aug;51(2):280-91.

Schapira DV, Kumar NB, Lyman GH. Obesity, Body Fat Distribution, and Sex Hormones in Breast Cancer Patients. *Cancer*. 1991 Apr 15;67(8):2215-8.

Scheven BA, Visser JW, Nijweide PJ. In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population. *Nature*. (1986 May) 321(6065):79-81.

Schinke T, McKee MD, Karsenty G. Extracellular matrix calcification: where is the action? *Nat Genet*. (1999 Feb) 21(2):150-1.

Selva DM, Hogeveen KN, Innis SM, Hammond GL. Monosaccharide-induced lipogenesis regulates the human hepatic sex hormone-binding globulin gene. *J Clin Invest*. 2007 Dez; 117(12):3979–3987

Sims NA, Dupont S, Krust A, Clement-Lacroix P, Minet D, Resche-Rigon M, Gaillard-Kelly M, Baron R. Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males. *Bone*. 2002 Jan; 30(1):18-25.

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*. 1994 Oct 20;331(16):1056-61. Erratum in: *N Engl J Med* 1995 Jan 12;332(2):131.

Sodek J, Cheifetz S (2000). Molecular regulation of osteogenesis. In: *Bone engineering*. J.E Davis editor. Toronto: em squared inc., pp. 31-43.

Stiller M, Rack A, Zabler S, et al. Quantification of bone tissue regeneration employing betatricalcium phosphate by three-dimensional non-invasive synchrotron micro-tomography – a comparative examination with histomorphometry. *Bone* (2009) 44: 619-628.

Stiller M, Kluk E, Böhner M, Lopez-Heredia MA, Müller-Mai C, Knabe C. Performance of β -

tricalcium phosphate granules and putty, bone grafting materials after bilateral sinus floor augmentation in humans. *Biomaterials*. 2014 Mar;35(10):3154-63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.068. Epub 2014 Jan 16.

Stoiber Kathrin Magdalena: Einfluss der Sexualhormone 17 β -Östradiol und Testosteron auf die Expression der Tissue Inhibitors of Matrix-Metallo Proteinases (TIMPs) in Smooth Muscle Cells (SMCs) der Aorta thoracalis des Kaninchens. Med Diss. 2007 Ulm.

Strietzel FP. Sinus floor elevation and augmentation. Evidence-based analysis of prognosis and risk factors. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 2004 Mar;8(2):93-105.

Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res*. (1997 Jun) 12(6):869-79.

Sun H, Wu C, Dai K, Chang J, Tang T: Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. *Biomaterials* 27 (33) (2006), 5651-7.

Szabo G, Suba Z, Hrabak K, Barabas J, Nemeth Z: Autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevations (2- and 3-dimensional computed tomographic, histologic, and histomorphometric evaluations): preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 16 (5) (2001), 681-92.

Szulc P, Munoz F, Claustrat B, Garnero P, Marchand F, Duboeuf F, Delmas PD: Bioavailable estradiol may be an important determinant of osteoporosis in men: the MINOS study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(1):192-199.

Tarsoly E, Jánossy J, Kosztura L. Effect of testosterone on fracture healing in hypophysectomized rats. *Acta Histochem*. (1979) 65(1):25-33.

Tuck SP, Scane AC, Fraser WD, Diver MJ, Eastell R, Francis RM. Sex steroids and bone turnover markers in men with symptomatic vertebral fractures. *Bone*. 2008 Dec;43(6):999-1005. doi: 10.1016/j.bone.2008.08.123. Epub 2008 Sep 11.

von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Buser D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. Clin Oral Implants Res 2001;12:260-269.

Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P. Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? Clin Oral Implants Res. 2003 Apr; 14(2):213-8.

World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA (2013) 310(20):2191-2194.

Zreiqat H, Markovic B, Walsh WR, Howlett CR: A novel technique for quantitative detection of mRNA expression in human bone derived cells cultured on biomaterials. J Biomed Mater Res 33 (4) (1996), 217-23.

Zreiqat H, Howlett CR: Titanium substrata composition influences osteoblastic phenotype: In vitro study. J Biomed Mater Res 47 (3) (1999), 360-6.

8 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Dr. Michael Stiller für die Überlassung des Themas und die hervorragende, chirurgisch operative Betreuung der Patienten bedanken.

Bei Prof. Dr. Christine Knabe möchte ich mich für die intensive Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Annekathrin Kopp danke ich für die Einführung in die histologische Bearbeitung von Biopaten und ihre sehr kompetente Beratung.

Ferner bedanke ich mich bei Prof. Dr. Schade-Brittinger und Herrn Alexander Reuss für die Diskussion der statistischen Auswertungen.

Prof. Kann danke ich für die hilfreiche Klärung von Zusammenhängen in der Endokrinologie.

Bei Prof. Radlanski und seiner Abteilung bedanke ich mich für die Einweisung und Überlassung des Mikroskopes.

Dr. Larry Fisher danke ich für die Zurverfügungstellung der Antikörper.

9 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die nachfolgend aufgeführten Professoren an der FU Berlin

Herr Professor Attin

Herr Professor Freesmeyer

Herr Professor Hoffmeister

Frau Professor Holtgrave

Herr Professor Kempfle

Herr Professor Kielbassa

Herr Professor Sauer

Herr Professor Siebert

10 Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutztechnischen Gründen in der elektronischen Version nicht enthalten

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung aus datenschutztechnischen Gründen in der elektronischen Version
nicht enthalten

12 Veröffentlichung

Knabe C*, Mele A*, Kann PH, Peleska B, Adel-Khattab D, Renz H, Reuss A, Böhner M, Stiller M.

Effect of sex-hormone levels, sex, body mass index and other host factors on human craniofacial bone regeneration with bioactive tricalcium phosphate grafts. Biomaterials 2017 Apr;123:48-62. (IF 8.557)